



Alexandra Nobre

# **Efeitos da Presença de Nanopartículas Poliméricas, Existentes em Tintas Aquosas, num Tratamento por Lamas Ativadas**

Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental

## **Orientação Científica:**

Doutora Susana P. S. C. Piçarra Gonçalves (Orientadora)

Doutora Ana Maria G. H. Barreiros Joanaz de Melo  
(Coorientadora)

## **Membros do Júri:**

Doutora Aldina Maria Pedro Soares (Presidente)

Doutora Susana P. S. C. Piçarra Gonçalves (Orientadora)

Doutora Ana Maria G. H. Barreiros Joanaz de Melo  
(Coorientadora)

Doutor Ricardo Manuel Nunes Salgado (Arguente)

Doutora Maria Teresa dos Santos (Arguente)

Outubro de 2012

CAPA

(Definida pelo IPS)



*A persistência compensa!*



# Agradecimentos

Existem várias pessoas que contribuíram para a concretização desta tese e sem as quais não teria sido possível levá-la a bom porto. Começando pelos técnicos de laboratório da EST Setúbal, Dina Galhanas e Artur Miranda, que providenciaram a alimentação dos *meus* microrganismos quando eu não o podia fazer. À Dina que acompanhava o seu desenvolvimento e sempre que eu chegava me dava boas novas. Ao Artur que os acompanhou durante a primeira quinzena de Agosto de 2011, permitindo-me uma pequena pausa depois de um ano de trabalho intensivo, tanto de estudos como de emprego.

Às professoras orientadores que, tal como a designação que têm, me orientaram nas alturas de pânico e compreenderam as minhas limitações de tempo, demonstrando uma enorme paciência perante os meus atrasos na escrita. E claro, a partilha de conhecimentos realizada e que muito me valorizou.

Aos colaboradores da ETAR de Setúbal, localizada em Praias do Sado, nomeadamente a Eng.<sup>a</sup> Ana Quintão e o Sr. Fernando Ferra, que se disponibilizaram, com prontidão, para fornecer as amostras de lamas ativadas sempre que considere necessário.

Ao Centro de Química-Física Molecular, do Instituto Superior Técnico, pela utilização de vários equipamentos em especial ao Prof. José Paulo Farinha pelas medidas de microscopia de força atómica.

Ao Instituto Politécnico de Setúbal pelo financiamento através do projeto #3 CP-IPS-7-2009.

E por fim, à família, principalmente ao mano pelas infinitas vezes que me interrompeu a escrita para perguntar “*Já está? Está a correr bem?*” e por todo o apoio dado no decorrer deste moroso e difícil processo.

A todos, muito obrigada!



# Resumo

Durante os últimos anos as tintas à base de solventes têm sido substituídas por tintas aquosas, devido à pressão crescente dos legisladores da União Europeia para reduzir as emissões de compostos orgânicos voláteis. A maior aplicação de tintas aquosas verifica-se na área decorativa e de proteção arquitetónica. Estas tintas são normalmente compostas por nanopartículas acrílicas ou estireno-acrílicas emulsificadas em água (para além de também conterem pigmentos e outros aditivos). Durante o seu ciclo de vida, estes materiais acabam por ser descarregados juntamente com os esgotos domésticos em estações de tratamento de águas residuais. Está comprovado que estes materiais são biocompatíveis quando utilizados em escala macroscópica, no entanto, tanto quanto sabemos, não existem ainda estudos acerca do seu comportamento sob a forma de nanopartículas.

O objetivo desta tese consiste em estudar o percurso das nanopartículas poliméricas utilizadas como base de tintas aquosas durante o tratamento biológico de uma estação de tratamento de águas residuais e verificar a sua influência na eficiência no processo de lamas ativadas.

Adicionando nanopartículas modelo de poli(metacrilato de butilo), com um diâmetro hidrodinâmico médio de  $\approx 50$  nm, a reatores descontínuos inoculados com lamas de uma estação de tratamento de águas residuais, estudou-se a influência deste possível xenobiótico na taxa de respiração específica dos microrganismos, na evolução da agregação das nanopartículas ao longo do tempo e a hipótese da sua sorção à população microbiana. Foram ainda instalados dois reatores descontínuos sequenciais à escala laboratorial e uma instalação piloto em contínuo (tanque de lamas ativadas e respetivo decantador) com vista ao estudo da influência destas nanopartículas na eficiência de remoção de nutrientes (carbono e azoto).

Os resultados obtidos permitiram excluir a hipótese de degradação das nanopartículas no tratamento biológico por lamas ativadas, concluindo-se ser o principal destino das mesmas a corrente de lamas, quer por agregação seguida de precipitação, quer por sorção a certos microrganismos. Concluiu-se ainda que a presença destas nanopartículas não influencia significativamente a remoção de carbono mas que exercem uma influência negativa na remoção de compostos azotados no tratamento biológico.

Em suma, embora macroscopicamente estes materiais sejam inócuos, o seu comportamento altera-se muito à nanoescala, sendo problemáticos para a população microbiana.

**Palavras-chave:** Nanopartículas, poli(metacrilato de butilo), lamas ativadas, águas residuais, carbono, azoto, reatores biológicos.





# Abstract

During recent years the solvent-based paints have been replaced by aqueous paints due to the increased pressure from European Union legislators to reduce emissions of volatile organic compounds. Aqueous paints are widely used for decoration and architectural protection. These paints are constituted by acrylic or styrene-acrylic nanoparticles emulsified in water (in addition with pigments and other additives). As part of their life cycle, these materials are frequently discharged in wastewater treatment plants. It is proven that these materials are biocompatible when used on a macroscopic scale, however, to our knowledge, this is the first time that their behavior as nanoparticles is being studied.

The aim of this thesis is to study the final destination of the polymeric nanoparticles used in aqueous paints formulations during the biological treatment of a wastewater treatment plant and to study their influence on the efficiency of nutrients removal during the activated sludge process.

Model nanoparticles of poly(butyl methacrylate), with an average hydrodynamic diameter of  $\approx 50$  nm, were added to several batch reactors and inoculated with sludge from a wastewater treatment plant. The influence of this possible xenobiotic in the respiration rate of the particular microorganisms, of the possibility of nanoparticles aggregation, and the possibility of its sorption to microbial population were studied. There were also installed two laboratorial scale sequential batch reactors and a pilot wastewater treatment plant (activated sludge tank and respective decanter) in order to study the influence of these nanoparticles in the removal efficiency of nutrients (nitrogen and carbon). The results allowed to exclude the possibility of nanoparticles degradation during the biological treatment by activated sludge and led to the conclusion that the main destination of the nanoparticles should be the sludge's line, either by aggregation followed by precipitation or by sorption to certain microorganisms. It was also concluded that the presence of these nanoparticles causes a decrease in the efficiency of removal of nitrogen compounds by the biological treatment but doesn't significantly affect the carbon removal.

In short, although being innocuous at macroscopic scale, their behavior is deeply changed at nanoscale, becoming hazardous to the microbial population.

**Keywords:** Nanoparticles, poli(butyl methacrylate), activated sludge, wastewater, carbon, nitrogen, biological reactors.



# Índice

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vii
Abstract .....	ix
Índice .....	xi
Lista de Figuras .....	xv
Lista de Tabelas .....	xvii
Lista de Siglas e Acrónimos .....	xix
Capítulo 1 : Introdução .....	1
1.1. Enquadramento .....	3
1.2. Hipóteses de interação de <i>nP</i> em águas residuais .....	10
1.3. Hipóteses de interação das <i>nP</i> numa estação de tratamento de águas residuais .....	11
1.4. Estado da arte .....	15
1.5. Regulamentação .....	18
Capítulo 2 : Materiais e Métodos .....	23
2.1. Nanopartículas .....	25
2.2. Inoculo .....	25
2.3. Meios sintéticos .....	26
2.4. Métodos analíticos .....	27
2.4.1. Determinação da carência química de oxigénio .....	27
2.4.2. Determinação do ião amónio .....	27
2.4.3. Determinação do ião nitrito .....	28
2.4.4. Determinação do ião nitrato .....	28
2.4.5. Determinação dos sólidos suspensos .....	29
2.5. Métodos instrumentais .....	30
2.5.1. Espectrofotometria de ultravioleta-visível .....	30
2.5.2. Cromatografia de permeação gel .....	30
2.5.3. Microscopia ótica .....	31
2.5.4. Microscopia de força atómica .....	32

2.5.5. Dispersão de luz dinâmica.....	32
<b>2.6. Reatores biológicos .....</b>	<b>34</b>
2.6.1. Reatores descontínuos.....	34
2.6.2. Reatores descontínuos sequenciais.....	37
2.6.3. Reatores contínuos.....	39
<b>Capítulo 3 : Tratamento e Discussão de Resultados .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Estudos de agregação das nP .....</b>	<b>43</b>
3.1.1. Em lamas brutas.....	43
3.1.2. No meio sintético .....	45
3.1.3. Numa solução de lamas ativadas e meio sintético .....	46
<b>3.2. Reatores descontínuos.....</b>	<b>49</b>
3.2.1. Ensaio respirométrico .....	49
3.2.2. Estudo da integridade da estrutura química das nPBMA após contacto com os microrganismos.....	50
3.2.3. Estudo da morfologia da superfície dos microrganismos contidos nas lamas ativadas após exposição às nPBMA .....	51
<b>3.3. Reatores descontínuos sequenciais .....</b>	<b>57</b>
3.3.1. pH, temperatura e concentração de oxigénio dissolvido.....	57
3.3.2. Carência química de oxigénio .....	58
3.3.3. Processo de nitrificação.....	60
3.3.4. Sólidos suspensos.....	63
<b>3.4. Reatores contínuos .....</b>	<b>64</b>
3.4.1. pH, temperatura e concentração de oxigénio dissolvido.....	64
3.4.2. Sólidos suspensos totais .....	66
3.4.3. Carência química de oxigénio .....	67
3.4.4. Processo de nitrificação.....	68
<b>Capítulo 4 : Conclusões e trabalho futuro .....</b>	<b>71</b>
<b>4.1. Conclusões .....</b>	<b>73</b>
<b>4.2. Trabalho futuro .....</b>	<b>74</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>77</b>
<b>Anexo 1 - Resumo da Comunicação em Poster Apresentada no ICOEH - International</b>	

<i>Conference on Occupational and Environmental Health – 17 a 19 de outubro de 2011 Porto, Portugal .....</i>	<b>A.1</b>
<b>Anexo 2 - Programa da Workshop em Projetos de Engenharia – IPS, em que se falou sobre “Efeitos da presença de nanopartículas poliméricas existentes em tintas aquosas num tratamento por lamas ativadas” – 3 de novembro de 2011, Setúbal, Portugal.....</b>	<b>A.2</b>
<b>Anexo 3 - Resumo da Comunicação em Poster Apresentada no MACRO 2012 - IUPAC World Polymer Congress - 24 a 29 junho 2012, Blackburg, USA.....</b>	<b>A.3</b>
<b>Anexo 4 - Resumo da Comunicação Oral Apresentada no 9th ISEG - International Symposium on Environmental Chemistry – 15 a 22 julho 2012, Aveiro, Portugal.....</b>	<b>A.4</b>



# Lista de Figuras

Figura 1.1 – Comparação entre as várias escalas do sistema métrico para a unidade de comprimento. Adaptado de [nanotech-101, 2011].	3
Figura 1.2 – Exemplos de nanomateriais a diferentes dimensões. Adaptado de [Kumar, 2009].	4
Figura 1.3 – Número de publicações científicas por campo de publicação [Brar, 2010].	6
Figura 1.4 – Exemplo genérico do ciclo de vida de um produto contendo <i>nP</i> . Adaptado de [Agency, 2007].	6
Figura 1.5 – Processo de evaporação de um filme de tinta a) de base orgânica, b) de base aquosa.	7
Figura 1.6 – Representação esquemática das interações que podem ocorrer nos vários tipos de tratamentos que acontecem numa ETAR. Adaptado de [Brar, 2010].	10
Figura 1.7 – Esquema de funcionamento da ETAR de Setúbal.	13
Figura 1.8 – Esquema representativo do metabolismo das bactérias quimioheterotróficas aeróbias que degradam a matéria orgânica existente no efluente. Adaptado de [Tchobanoglous, 2003].	14
Figura 1.9 – Os três pilares da estratégia europeia para 2020. Adaptado de [ObservatoryNANO, 2011].	18
Figura 1.10 – Pirâmide regulamentar. Adaptado de [ObservatoryNANO, 2011].	22
Figura 2.1 – Constituição esquemática do sistema de GPC utilizado.	31
Figura 2.2 – Esquema de funcionamento de um microscópio de força atómica. Adaptado de [Science in your eyes, 2012].	32
Figura 2.3 – Constituição esquemática de um equipamento de DLS.	33
Figura 2.4 – Ensaio correspondentes aos testes respirométricos, durante o tempo de contacto com a emulsão.	36
Figura 2.5 – Célula estanque para medição do OD.	36
Figura 2.6 – Instalação de SBR.	37
Figura 2.7 – Fases do SBR consideradas neste trabalho experimental.	38
Figura 2.8 – Instalação de lamelas ativadas.	39
Figura 3.1 – Histograma da distribuição das partículas em suspensão nas lamelas brutas.	43
Figura 3.2 – Taxa específica de respiração de acordo com a concentração de <i>nPBMA</i> .	49



Figura 3.3 – Cromatograma obtido após a injeção da amostra com 10 mg/L <i>n</i> PBMA.....	51
Figura 3.4 – Zonas de recolha das amostras de microrganismos nos reatores descontínuos para análise por microscopia de força atômica.....	52
Figura 3.5 – Imagens de AFM (esquerda imagem obtida em <i>fase</i> ; direita: reconstrução topográfica) de um microrganismo presente no ensaio em branco.....	53
Figura 3.6 – Imagens de AFM (esquerda: imagem obtida em <i>fase</i> ; direita: reconstrução topográfica) de dois microrganismos presentes nas lamelas em suspensão do ensaio contendo 30 ppm <i>n</i> PBMA .....	54
Figura 3.7 – Ampliações sucessivas do retângulo vermelho do microrganismo (b) da figura 3.6 do reator contendo 30 mg/L de <i>n</i> PBMA .....	55
Figura 3.8 – Imagens de AFM (esquerda imagem obtida em <i>fase</i> ; direita: reconstrução topográfica) de um microrganismo da biomassa alojada na parede do reator contendo 30 mg/L <i>n</i> PBMA.....	56
Figura 3.9 – Carbono orgânico oxidável medido em ambos os SBR ao longo do tempo (normalizados face ao carbono orgânico oxidável medido no início do ciclo para o respetivo SBR).....	59
Figura 3.10 – Consumo global de carbono orgânico nos SBR. ....	59
Figura 3.11 – Variação das concentrações de iões amónio, nitrito e nitrato no reator isento de <i>n</i> PBMA (branco). ....	60
Figura 3.12 – Variação das concentrações de iões amónio, nitrito e nitrato no reator contendo 30 mg/L de <i>n</i> PBMA. ....	61
Figura 3.13 – Percentagem de remoção de N obtida no processo de nitrificação em ambos os reatores. ....	62
Figura 3.14 – Consumo de $\text{N-NH}_4^+$ por unidade de massa de microrganismos durante o processo de nitrificação em ambos os reatores .....	63
Figura 3.15 – Variação da concentração de SST no tanque de arejamento e na saída do decantador do reator contínuo. ....	66
Figura 3.16 – Percentagem de remoção de carbono orgânico nos reatores contínuos.....	67
Figura 3.17 – Percentagem de remoção de $\text{N-NH}_4^+$ nos reatores contínuos, sem <i>n</i> P e na presença de 30 mg/L <i>n</i> PBMA. ....	68
Figura 3.18 – Variação das concentrações de $\text{N-NH}_4^+$ (▲), $\text{N-NO}_2^-$ (✱) e $\text{N-NO}_3^-$ (●) no reator contínuo sem adição de <i>n</i> PBMA e, posteriormente contendo 30 mg/L <i>n</i> PBMA. ....	69

# Lista de Tabelas

Tabela 1.1 – Exemplos de aplicações de nanomateriais [Senjen, 2009] .....	5
Tabela 1.2 – Dados referentes à ETAR de Setúbal.....	12
Tabela 1.3 – Condições necessárias para a ocorrência de nitrificação num reator biológico. Adaptado de [Tchobanoglous, 2003]. .....	15
Tabela 2.1 – Constituição de 10 L do meio sintético utilizado nos reatores biológicos: soluções base e respetivas quantidades. Adaptado de [Barreiros, 2003]. .....	26
Tabela 2.2 – Volumes utilizados nos vários ensaios referentes aos testes respirométricos, expressos em mL.....	35
Tabela 3.1 – Testes de lamas brutas com diferentes concentrações de <i>nPBMA</i> . .....	44
Tabela 3.2 – Histogramas obtidos por medidas de dispersão de luz dinâmica ao meio mineral contendo 30 ppm de <i>nPBMA</i> , ao longo do tempo. ....	46
Tabela 3.3 – Histogramas obtidos por medidas de dispersão de luz dinâmica a amostras recolhidas do reator descontínuo a operar com 10 mg/L de <i>nPBMA</i> .....	47
Tabela 3.4 – Histogramas obtidos por medidas de dispersão de luz dinâmica a amostras recolhidas do reator descontínuo a operar com 100 mg/L de <i>nPBMA</i> .....	48
Tabela 3.5 – Condições de ocorrência de nitrificação e valores médios monitorizados nos SBR implementados. ....	58
Tabela 3.6 – Condições para a ocorrência de nitrificação e valores médios monitorizados nos reatores implementados. ....	65



# Lista de Siglas e Acrónimos

A	Ensaio abiótico, para os testes respirométricos
Abs	Absorvência
AFM	Microscopia de Força Atômica ( <i>Atomic Force Microscopy</i> )
ATU	Alitiurreia
B1/B2	Ensaio em branco, para os testes respirométricos
BREF	Documento MTD de Referência ( <i>Best Available Technologies Reference Document</i> )
C <sub>0</sub>	Concentração inicial
C <sub>i</sub>	Concentração no instante t
CBO	Carência Bioquímica de Oxigénio
Conc.	Concentração
COV	Compostos Orgânicos Voláteis
CQO	Carência Química de Oxigénio
3,5-DCP	3,5-Diclorofenol
DLS	Dispersão de Luz Dinâmica ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
D <sub>m</sub>	Diâmetro hidrodinâmico médio
e.m.q.	Erro médio quadrático
e.p.	Equivalente de população
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
GPC	Cromatografia de Permeação Gel ( <i>Gel Permeation Chromatography</i> )
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução ( <i>High Precision Liquid Chromatography</i> )
INAG	Instituto Nacional da Água

I&D	Investigação e Desenvolvimento
I&DT	Investigação e Desenvolvimento Tecnológico
ISO	Organização Internacional de Normalização ( <i>International Standards Organization</i> )
MTD	Melhores Tecnologias Disponíveis
NED	Diclorato de N-(1-naftil)-etilenodiamina
<i>n</i> P	Nanopartículas
<i>n</i> PBMA	Nanopartículas de poli(metacrilato de butilo)
<i>n</i> TCMP	nanoTubos de Carbono de Múltiplas Paredes
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
OD	Oxigénio Dissolvido
PCIP	Prevenção e Controlo Integrados da Poluição
pH	Potência hidrogeniónica
<i>r</i>	Taxa de recirculação
R1/R2	Ensaio de referência, para os testes respirométricos
R	Taxa de consumo de O <sub>2</sub>
R <sub>s</sub>	Taxa específica de respiração
SBR	Reator descontínuo sequencial ( <i>Sequencing Batch Reactor</i> )
SDS	Dodecilsulfato de sódio ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
SEM	Microscopia Eletrónica de Varrimento ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
SPE	Substâncias poliméricas extracelulares
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
<i>t</i>	Tempo

T	Temperatura
TEM	Microscopia Eletrónica de Transmissão ( <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
THF	Tetrahidrofurano
$t_{RH}$	Tempo de retenção hidráulica
UE	União Europeia
UV-vis	Ultravioleta-visível
$V_e$	Volume de retenção
v.r.	Variância relativa



# Capítulo 1 : Introdução

Neste capítulo encontra-se o enquadramento, motivação, objetivos e organização da dissertação. Inicia-se com uma breve explicação dos vários mecanismos de interação sobre nanopartículas em águas residuais e do seu possível destino nas várias etapas do processo de tratamento de águas residuais. Termina com um resumo do estado da arte dos trabalhos publicados sobre os efeitos da presença de nanopartículas em geral em sistemas de lamas ativadas e com uma resenha da regulamentação sobre o tema em estudo.





## 1.1. Enquadramento

Decorria o ano de 1959 quando Richard Feynman, durante o congresso anual da *American Physical Society* realizado no *California Institute of Technology*, em Caltech, lançou o desafio “Acha possível escrever na cabeça de um alfinete os 24 volumes da *Enciclopédia Britânica*? Vai provavelmente responder que não. De facto, teria que escrever cada letra da enciclopédia num espaço 1000 vezes menor do que a espessura de um cabelo humano. Contudo, por incrível que pareça, este processo é perfeitamente possível. Mas como? Bem, terá de escrever com átomos, manipulando cada átomo individualmente” [Feynman, 1960].

Foi assim que, pela primeira vez, a comunidade científica despertou para o mundo ainda por descobrir da nanoescala.

É importante, antes de mais, definir o que representa o prefixo *nano*. Este prefixo provém da palavra grega *nanos* que significa anão. No sistema métrico representa mil milhões de partes ( $10^{-9}$ ) da unidade, pelo que 1 nanómetro (1 nm) representa  $10^{-9}$  metro ( $10^{-9}$  m).

Na figura 1.1 encontra-se a comparação entre as várias escalas do sistema métrico, para a unidade de comprimento.



Figura 1.1 – Comparação entre as várias escalas do sistema métrico para a unidade de comprimento. Adaptado de [nanotech-101, 2011].

A nanotecnologia é uma área em desenvolvimento e, por isso, não existe ainda uma definição de nanomateriais estabelecida, mas apenas uma definição de trabalho que é a seguinte:

*Nanomateriais são todos os materiais que apresentam, pelo menos, uma dimensão inferior a 100 nm.*

Atendendo a este conceito podem distinguir-se nanomateriais a:

- a) 1 dimensão, como por exemplo filmes;
- b) 2 dimensões, o caso das fibras, e;
- c) 3 dimensões, tal como partículas [Government, 2006]

representados na figura 1.2.

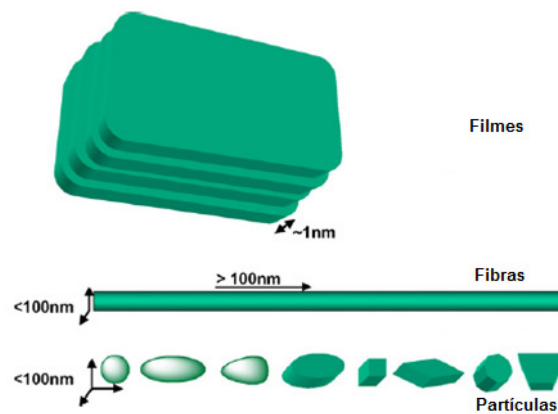


Figura 1.2 – Exemplos de nanomateriais a diferentes dimensões. Adaptado de [Kumar, 2009].

Os nanomateriais são, hoje em dia, utilizados nas mais variadas áreas, para os mais diversos fins, desde a libertação controlada de fármacos no organismo, teragnóstico, passando por bactericidas, embalagens alimentares, tintas, cosméticos, etc. Na tabela 1.1 encontram-se alguns exemplos de nanomateriais e respetivas aplicações.

Tabela 1.1 – Exemplos de aplicações de nanomateriais [Senjen, 2009]

Nanomaterial	Quantidade de produtos existentes no mercado mundial	Aplicações
Prata	235	Meias, escovas de cabelo, emplastros, embalagens alimentares, suplementos alimentares
Carbono (incluindo fulereno)	71	Materiais de desporto, dispositivos de filtragem, cosméticos, <i>hardware</i> de computador
Dióxido de titânio	38	Tintas, protetores solares, produtos de limpeza, revestimentos antibacterianos, produtos de limpeza
Óxido de zinco	29	Protetores solares
Sílica (dióxido de silício)	31	Tintas, produtos de limpeza, cosméticos, materiais de desporto
Ouro	16	Cosméticos, produtos de higiene pessoal, catalisadores de combustível

De notar que embora nesta tabela, datada de 2009, não surjam nanomateriais de origem polimérica, sabe-se que nanopartículas (*nP*) desta composição podem ser encontradas em aplicações associadas à libertação de fármacos no organismo (mais especificamente no tratamento de tumores), no fabrico de tintas protetoras, adesivos, novos materiais com propriedades específicas (ex.: superfícies auto-regenerativas), entre outros. A indústria farmacêutica tem mesmo vindo a substituir as *nP* poliméricas biodegradáveis por polímeros biocompatíveis. Neste último grupo de polímeros englobam-se o poli(metacrilato de metilo), o polietilenoglicol, o poli(ácido acrílico), entre outros [Nanopharmaceuticals, 2011]. No que diz respeito à produção de tintas aquosas para aplicações decorativas, as nanopartículas mais comuns são formadas por co-polímeros de origem acrílica e estireno-acrílica [Keddie, 2010].

Embora genericamente as aplicações sejam já consideráveis, o conhecimento científico sobre nanomateriais e as consequências da sua interação com o meio natural está ainda no início pelo que o rápido crescimento da nanotecnologia apresenta, necessariamente, novos desafios. Estes desafios incluem várias questões como as limitações dos dados e da incerteza sobre a saúde e efeitos ambientais dos nanomateriais.

Brar efetuou um levantamento dos artigos científicos referentes a nanomateriais, mais especificamente nanopartículas, publicados até Dezembro de 2008 [Brar, 2010]. Como se comprova na figura 1.3, o autor verificou que existe escassez de informação relativamente aos efeitos destes materiais nos vários compartimentos ambientais, uma vez que a esmagadora

maioria das publicações recai sobre a sua síntese. Neste estudo apenas foram consideradas *nP* de origem antropogénica.

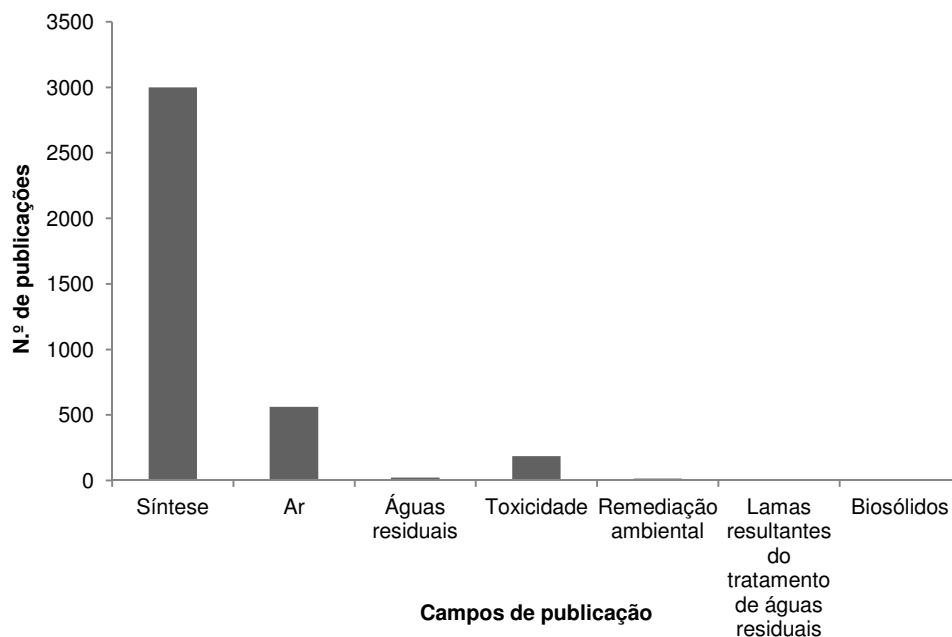


Figura 1.3 – Número de publicações científicas por campo de publicação [Brar, 2010].

Ao longo de todo o ciclo de vida dos produtos contendo nanomateriais, representado na figura 1.4 por mais eficiente que seja a sua utilização, existe sempre a possibilidade de libertação para o meio ambiente, seja na fase sólida (libertação para o solo) seja através de lixiviados (libertação para o meio aquático).

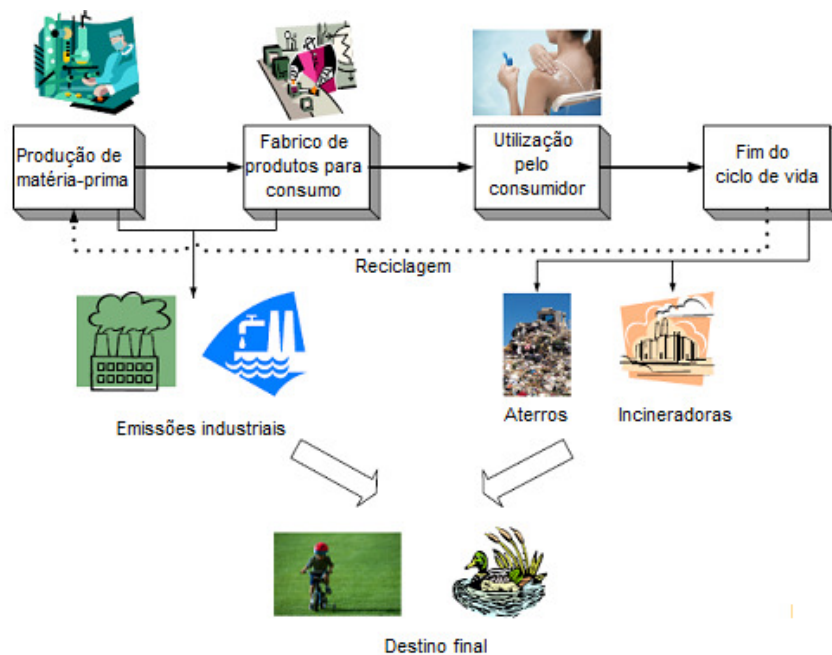


Figura 1.4 – Exemplo genérico do ciclo de vida de um produto contendo *nP*. Adaptado de [Agency, 2007].

Existem ainda poucos estudos disponíveis sobre o destino final dos nanomateriais no ambiente, razão pela qual não são ainda bem conhecidas as suas propriedades fundamentais relativas a esse aspeto [Agency, 2007]. Também a monitorização quantitativa das emissões de nanomateriais para o ambiente está ainda numa fase inicial, no entanto os poucos estudos disponíveis revelam que a sua entrada no ambiente é feita maioritariamente através das águas residuais, lamas e incineração de produtos contendo nanomateriais [Gottschalk, 2011].

A Diretiva Europeia 2004/45/EC veio limitar o teor de Compostos Orgânicos Voláteis (COV) existentes em tintas e vernizes, com o principal objetivo de prevenir a formação de ozono na troposfera. É sabido que este gás não é prejudicial quando se encontra ao nível da estratosfera pois filtra a radiação ultravioleta proveniente do Sol. Acontece que o mesmo já não se verifica quando encontrado na troposfera: aqui, o ozono provoca não só problemas respiratórios no ser humano, como a degradação de tecidos vivos e plantas. O ozono é, assim, um poluente secundário que se forma através de reações entre óxidos de azoto e os referidos COV.

A obrigação de diminuir o teor de COV nas tintas e vernizes implicou uma revolução neste tipo de indústria. O fino filme que se forma sobre uma superfície pintada corresponde, microscopicamente, a uma série de cadeias poliméricas entrelaçadas, que “aprimoram” os pigmentos (cuja função é dar cor ao filme) e outros aditivos, para além de garantirem maleabilidade no filme formado (se fosse demasiado rígido, a formação de rachas seria facilitada, etc.). Ora o principal contributor para a emissão de COV era, justamente, o solvente orgânico que se usava para dissolver as cadeias poliméricas, para que a tinta se conservasse no estado líquido antes de ser aplicada (ver figura 1.5a). Como os polímeros utilizados não são solúveis em solventes verdes como a água, a obrigação de diminuir a emissão de COV provocou uma verdadeira reformulação da constituição destes materiais. Em vez de introduzir os polímeros já dissolvidos no solvente orgânico, passaram a usar-se nanopartículas poliméricas emulsionadas em água. Ao evaporar, as *nP* entram em contacto umas com as outras e, sob condições adequadas, ocorre interdifusão das cadeias contidas em *nP* vizinhas, formando-se, no final, um filme polimérico homogéneo com características semelhantes ao anteriormente produzido com solventes (ver figura 1.5b).

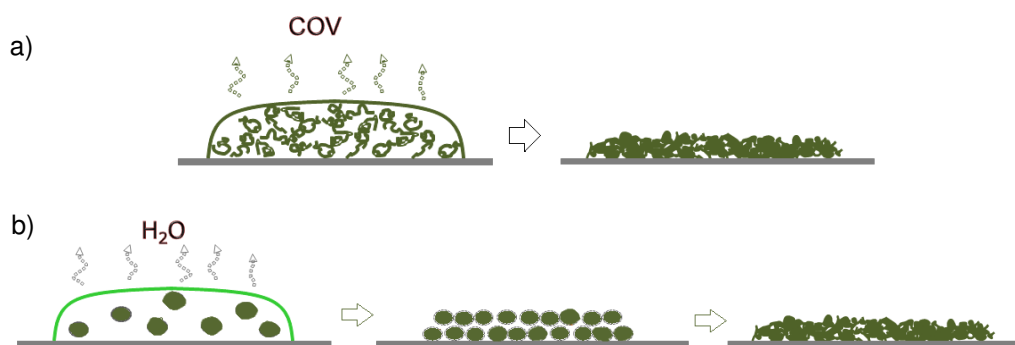


Figura 1.5 – Processo de evaporação de um filme de tinta a) de base orgânica, b) de base aquosa.

Como os restos das tintas (provenientes da lavagem de materiais de pintura, etc.) costumam ser descarregados com o esgoto doméstico torna-se importante estudar o efeito que este tipo de nanopartículas terá após a sua descarga, nomeadamente como parte do efluente bruto que chega às Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR).

É do conhecimento geral que as águas residuais podem ser submetidas a diversos tipos de tratamento, onde se incluem o físico, o químico e o biológico, dependendo das características do efluente e da sua proveniência (doméstico ou industrial). Em termos gerais, as *nP* são mais suscetíveis de serem afetadas por processos de aglomeração (por exemplo, no decantador primário) e, eventualmente, por reações químicas [Agency, 2007]. A capacidade de qualquer um desses processos para imobilizar ou destruir as nanopartículas dependerá de vários fatores, a saber:

- Propriedades específicas da partícula – tamanho, forma, composição química, carga superficial e revestimento, por exemplo;
- Estado da partícula – livre ou incorporada numa matriz;
- Propriedades químicas do meio que contém as nanopartículas – pH, força iónica, composição iónica, teor de matéria orgânica, por exemplo e,
- Condições hidrodinâmicas – por exemplo o tempo de residência das nanopartículas em cada órgão da estação de tratamento de efluentes, regime de escoamento, agitação, etc. [Petosa, 2010].

Foram já desenvolvidos alguns estudos relativamente à toxicidade de alguns tipos de nanopartículas nos microrganismos que compõem o sistema de lamas ativadas [Brar, 2010]. No entanto, tanto quanto se sabe, não existem ainda estudos publicados com nanopartículas poliméricas, daí a relevância deste projeto.

Tendo em conta esta realidade, os objetivos gerais deste projeto são verificar o efeito da presença de nanopartículas poliméricas, semelhantes às existentes em tintas aquosas, na eficiência do processo biológico de uma ETAR e qual o seu destino final.

Para este estudo decidiu utilizar-se nanopartículas de poli(metacrilato de butilo), *nPBMA*, perfeitamente caracterizadas como composto modelo das *nP* poliméricas que constituem as tintas e vernizes aquosos (ver ponto 2.1). A necessidade de utilizar um composto modelo, contrariamente à utilização de uma tinta comercial, prende-se com a grande dispersão de dimensões das partículas que esta apresenta. Uma tinta comercial é composta por várias nanopartículas com composição e diâmetros diferentes. Este facto iria dificultar a interpretação dos resultados, uma vez que técnicas como a dispersão de luz dinâmica perdem muita qualidade em amostras com várias distribuições de diâmetros, podendo por em causa a qualidade das conclusões a retirar do estudo.

O efeito da presença de *nPBMA* nos microrganismos constituintes das lamas ativada foi testado através da determinação da sua taxa de respiração específica e do seu desempenho nos processos de nitrificação e remoção de carbono.

O destino das *nPBMA* nas lamas ativadas foi seguido através de várias técnicas instrumentais de análise, como a cromatografia de permeação gel e a dispersão de luz dinâmica, e de técnicas microscópicas avançadas como a microscopia de força atômica, descritas no capítulo 2.

Para um melhor entendimento do trabalho desenvolvido esta tese está estruturada em 4 capítulos:

O capítulo 1 – Introdução – divide-se em 5 pontos, começa por fazer-se o enquadramento do tema, descreve-se a motivação e os objetivos do projeto, assim como a organização e breve descrição dos vários capítulos. Nos pontos 2 e 3 faz-se uma breve alusão ao funcionamento de uma ETAR e aos mecanismos de interação de nanopartículas (*nP*) em águas residuais. Este capítulo termina com um resumo do estado da arte relativamente aos efeitos da presença de *nP* em sistemas de lamas ativadas e um apanhado da regulamentação relativa ao tema em estudo.

No capítulo 2 – Materiais e Métodos – inclui a caracterização das *nP* utilizadas como modelo, do inoculo e dos meios sintéticos e a descrição dos métodos analíticos e instrumentais utilizados, bem como a descrição dos reatores implementados e das respetivas condições de funcionamento.

O capítulo 3 – Tratamento e Discussão de Resultados – apresenta e discute os resultados obtidos ao longo do trabalho experimental.

No capítulo 4 – Conclusões – encontram-se descritas as principais conclusões retiradas dos resultados obtidos e que dão resposta aos objetivos inicialmente definidos. É também neste capítulo que se apresentam propostas para trabalhos futuros.



## 1.2. Hipóteses de interação de *nP* em águas residuais

Devido às suas dimensões mais reduzidas, a interação de *nP* com superfícies sólidas e outras *nP* será provavelmente muito diferente da interação entre micropartículas. Esta interação à nanoescala pode influenciar o seu transporte, deposição e agregação no meio aquático e, desse modo, no processo de tratamento das águas residuais [Petosa, 2010]. No seu artigo de revisão Brar refere os possíveis mecanismos de interação que poderão ocorrer durante a presença de *nP* numa ETAR [Brar, 2010]. De acordo com a figura 1.6., são elas: bioacumulação, agregação, sorção/dessorção, transporte e deposição.

Para que a bioacumulação das *nP* por parte dos microrganismos possa ocorrer é necessário que se verifiquem alguns dos restantes mecanismos enunciados. Em primeiro lugar as *nP* terão de se deslocar pela solução até chegarem a uma área próxima da superfície do microrganismo, fluxo este denominado por difusão (transporte passivo). Durante esta deslocação pela solução, as *nP* podem sofrer sorção a outros sólidos e/ou a outras espécies em suspensão. Em seguida poderão ligar-se a um local específico na membrana celular no microrganismo – sorção. Se as *nP* forem internalizadas poderá ocorrer bioacumulação [Brar, 2010].

As partículas que aderem ou são assimiladas pelos microrganismos, criam um gradiente de concentração na camada imediatamente acima das células microbianas. Este gradiente impulsiona o transporte, por difusão, das partículas. As taxas de transporte difusional são função da dimensão e da forma das partículas, bem como da viscosidade dos meios de comunicação (neste caso, águas residuais). As pequenas partículas difundem-se mais rapidamente do que as partículas de maiores dimensões, sendo este um dos destinos prováveis das nanopartículas com dimensões mais reduzidas [Brar, 2010].

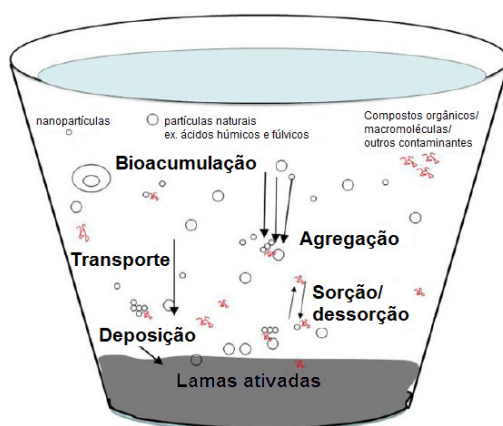


Figura 1.6 – Representação esquemática das interações que podem ocorrer nos vários tipos de tratamentos que acontecem numa ETAR. Adaptado de [Brar, 2010].

A agregação de *nP* pode envolver a adesão de partículas individuais ou grupos de partículas em massas maiores devido a forças de atração, ligações químicas ou mecânicas [Brar, 2010]. Já foram detetados agregados irreversíveis em micrografias eletrónicas de óxidos metálicos [Limbach, 2005],  $C_{60}$  e outros fulerenos [Fortner, 2005] e nanotubos de carbono [Lisunova, 2006]. Algumas *nP*, produzidas como partículas individuais, como é o caso da sílica amorfa, também poderão interagir entre si e formar agregados reversíveis, se existir um potencial atrativo entre si [Brar, 2010].

No que à deposição diz respeito, a taxa de sedimentação gravitacional é significativamente diferente de acordo com o tamanho e a densidade das partículas, embora as velocidades de sedimentação de partículas pequenas possam ser muito baixas. No caso das nanopartículas, o efeito gravitacional é insignificante podendo tornar-se significativo apenas quando estas se ligam entre si ou a outras partículas coloidais presentes no efluente. A ligação entre partículas, a partículas coloidais e a micropartículas pode alterar o respetivo diâmetro hidrodinâmico, com a correspondente mudança de densidade e de fluabilidade [Tirado-Miranda, 2003] e, conseqüentemente, nas taxas de sedimentação.

Em suma, com a presença de *nP* poliméricas, neste caso específico, numa estação de tratamento de águas residuais qualquer um destes mecanismos poderá ocorrer e, posteriormente, afetar a eficiência da ETAR.

### **1.3. Hipóteses de interação das *nP* numa estação de tratamento de águas residuais**

É sabido que todas as águas residuais, sejam industriais ou domésticas, devem receber tratamento antes de serem descarregadas no meio hídrico, de modo a cumprir os requisitos legais e evitar a poluição no meio recetor. Torna-se, por isso, relevante referir, sinteticamente, o princípio de funcionamento de uma ETAR. Como o inóculo utilizado foi recolhido na ETAR de Setúbal, localizada em Praias do Sado, é o seu esquema de funcionamento que se representa na figura 1.7 e se descreve de seguida. Esta ETAR tem uma capacidade de tratamento equivalente a 253000 habitantes, dos quais 143000 correspondem à fração industrial. Na tabela 1.2 encontram-se os dados referentes à ETAR em questão.

Tabela 1.2 – Dados referentes à ETAR de Setúbal.

Caudal médio diário anual	12682 m <sup>3</sup> /dia (ano de 2011)
População	253107 e.p.
Fração de caudal industrial	28%
Carga orgânica (CBO <sub>5</sub> )*	13984 kg/dia
Sólidos Suspensos Totais	22780 kg/dia
Azoto total	1622 kg/dia
Fósforo total	292 kg/dia

\* CBO<sub>5</sub> – Quantidade de oxigénio necessária para oxidar a matéria orgânica biodegradável, durante 5 dias.

O reator biológico (tanque de arejamento) desta estação caracteriza-se por um tempo de retenção hidráulico de 13,2 horas e um caudal de recirculação de lamas de aproximadamente 19000 m<sup>3</sup>/dia, sendo a idade das lamas de 5,2 dias.

Nesta instalação, para além do tratamento do efluente (linha líquida), existem ainda as linhas de tratamento de lamas, de tratamento de odores e a linha de biogás.

O tratamento na linha líquida inicia-se com um pré-tratamento, através de processos físicos, que consiste na remoção de sólidos grosseiros, areias e gorduras. Os subprodutos removidos nesta fase do tratamento são encaminhados para aterro sanitário (gradados e areias) enquanto as gorduras são submetidas a um tratamento específico. Após este pré-tratamento o efluente sofre uma sedimentação, no decantador primário, para remoção dos sólidos de menor dimensão. Estes sólidos constituirão as lamas primárias que seguem para a linha de tratamento de lamas.

Em seguida ocorre a oxidação dos compostos de carbono e a remoção de nutrientes (azoto e fósforo), no reator biológico. Este reator apresenta uma zona aeróbia (onde ocorre a nitrificação) e uma zona anóxica (onde se dá a desnitrificação). As lamas biológicas que aqui se desenvolvem são separadas do efluente tratado através de um segundo processo de sedimentação. O efluente já tratado é então encaminhado para a última fase de tratamento – a desinfecção. Esta última fase é feita através de radiação ultravioleta que permite inativar os microrganismos ainda presentes no efluente tratado.

Não se descrevem os processos aplicados nas linhas de tratamento de lamas, de tratamento de odores e na linha de biogás uma vez que, por agora, não são considerados relevantes para o desenvolvimento deste trabalho.

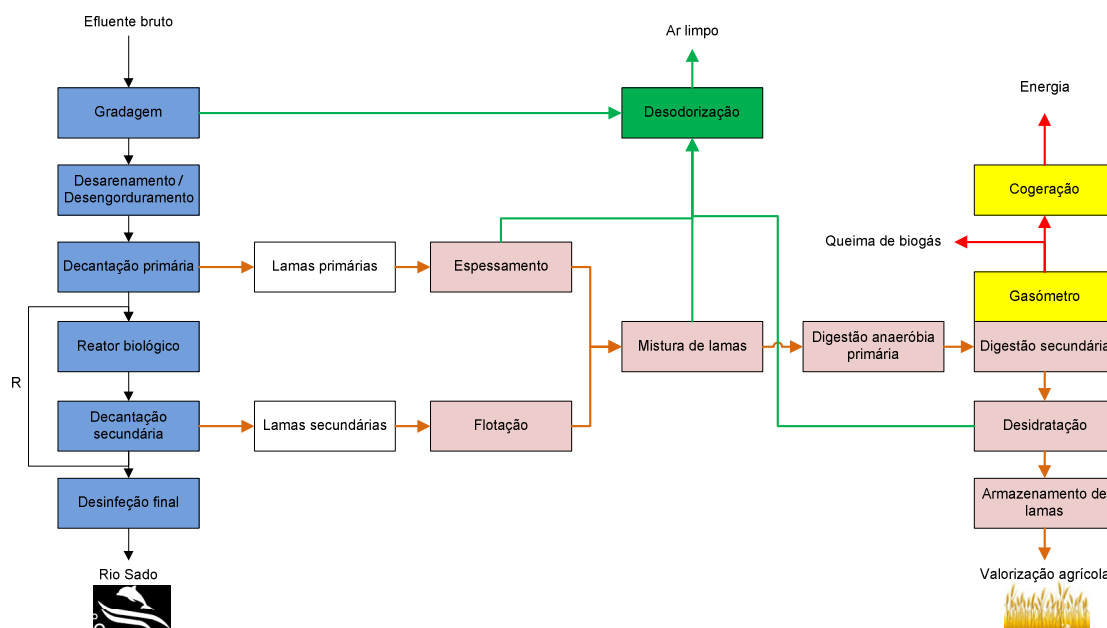


Figura 1.7 – Esquema de funcionamento da ETAR de Setúbal.

■ Tratamento na linha líquida; ■ Tratamento de lamas; ■ Tratamento de odores; ■ Linha de biogás.

Com base nos mecanismos descritos no ponto anterior, ao entrar na ETAR, um efluente que tem na sua composição  $nP$  passará pelas várias etapas já aqui descritas pelo que estas poderão ter vários destinos. O pré-tratamento, assim como o tratamento primário (decantador primário), baseia-se em processos físicos (filtração, sedimentação e flutuação) pelo que nesta etapa dificilmente as  $nP$  ficarão retidas. Existe, no entanto, a possibilidade de ocorrer agregação das  $nP$  entre si ou de sorção a outros materiais em suspensão, caso haja alteração das propriedades químicas ou hidrodinâmicas do meio, pelo que não se exclui a hipótese de que algumas  $nP$  passem para a linha de lamas nesta fase. No tratamento secundário podemos avançar com quatro possibilidades: 1) a degradação das  $nP$  por parte dos microrganismos, 2) agregação das  $nP$  entre si e posterior precipitação, 3) sorção das  $nP$  aos microrganismos ou 4) as  $nP$  não sofrerem qualquer tipo de interação com os microrganismos. No caso de se verificar a primeira hipótese então as  $nP$  serão removidas na ETAR; considerando que ocorrem as hipóteses 2 e 3, as  $nP$  serão removidas juntamente com as lamas; no caso da hipótese 4 as  $nP$  continuarão na linha líquida e seguirão para a etapa de desinfecção, onde não se espera que sofram qualquer efeito, saindo no efluente tratado.

Caso as  $nP$  sejam removidas nas lamas e estas venham a ser posteriormente utilizadas na agricultura corre-se o risco de bioacumulação das  $nP$  nos produtos aí cultivados. Mas, no caso de saírem no efluente tratado, também poderão provocar problemas ecotoxicológicos no meio recetor, ao nível de fauna e/ou flora.

Assim sendo, verifica-se que o destino das  $nP$  se decide, maioritariamente, no reator biológico, durante o tratamento secundário. As  $nP$  poderão ainda influenciar a eficiência dos

próprios processos de tratamento que aí ocorrem.

Tendo em conta a obrigatoriedade das ETAR em cumprir a legislação referente à qualidade do efluente que é descarregado no meio hídrico (Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de junho), nomeadamente no que diz respeito à remoção de carbono optou-se, neste trabalho, por estudar o efeito da presença das *nPBMA* nesse processo de remoção de carbono. Como é um processo, geralmente, aeróbio ocorre em simultâneo com a nitrificação, pelo que também este processo de remoção de compostos azotados foi estudado face à presença de *nPBMA*.

Torna-se, deste modo, importante descrever os processos de degradação da matéria orgânica e de nitrificação que decorrem no reator biológico.

A degradação da matéria orgânica é feita por bactérias quimioheterotróficas que metabolizam por respiração os substratos orgânicos existentes na água residual formando dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e biomassa celular, como representado na figura 1.8. A quantidade de oxigénio necessária para a degradação química da matéria orgânica presente no efluente é indicativa da quantidade de carbono oxidável e determina-se através da carência química de oxigénio (CQO).

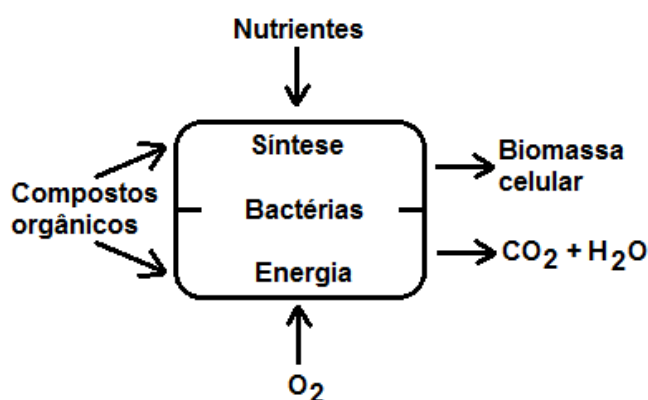
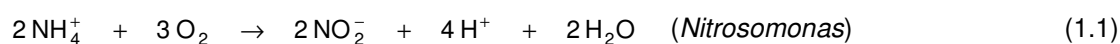
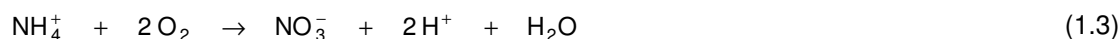


Figura 1.8 – Esquema representativo do metabolismo das bactérias quimioheterotróficas aeróbias que degradam a matéria orgânica existente no efluente. Adaptado de [Tchobanoglous, 2003].

A nitrificação é o processo através do qual o ião amónio ( $\text{NH}_4^+$ ) é oxidado biologicamente a ião nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e que ocorre em duas etapas, tendo como intervenientes dois tipos diferentes de bactérias autotróficas específicas. Na primeira etapa o azoto, na forma de ião amónio, é oxidado a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pelas bactérias *Nitrosomonas sp* e, em seguida o nitrito é oxidado pelas *Nitrobacter sp* a nitrato, de acordo com as reações seguintes.



A reação total do processo de nitrificação é:



O crescimento específico das *Nitrobacter* é maior do que o crescimento específico das *Nitrosomonas* e, portanto, se as condições forem adequadas para o seu crescimento não haverá acumulação de nitritos nos sistemas de tratamento. A velocidade de crescimento das *Nitrosomonas* controla geralmente a reação global de nitrificação. Estas bactérias tornam-se mais eficientes com a idade [Eckenfelder, 1989].

Uma vez que estes processos consomem oxigênio, para que ocorram, serão necessárias condições específicas, nomeadamente de concentração de oxigênio dissolvido (OD). Na tabela 1.3 encontram-se os intervalos considerados ótimos para a ocorrência de nitrificação.

Tabela 1.3 – Condições necessárias para a ocorrência de nitrificação num reator biológico.

Adaptado de [Tchobanoglous, 2003].

	pH	T (°C)	OD (mg/L)
Intervalo ótimo	7,00 – 8,50	25 – 35	3,00 – 4,00
Intervalo de inibição	< 6,80	T < 5 ; T > 45	< 2,00

Como as bactérias nitrificantes são muito sensíveis ao OD, assume-se que no intervalo ótimo para a ocorrência de nitrificação, estão também reunidas as condições para que ocorra a degradação da matéria orgânica.

Como a principal interferência das *nP* num sistema de tratamento por lamas ativadas se verifica no tanque de lamas ativadas, este estudo debruça-se sobre os processos que aí decorrem e nas possíveis alterações sofridas pela população microbiana devido à presença de nanopartículas.

## 1.4. Estado da arte

Os efeitos resultantes da presença de alguns nanomateriais em sistemas de tratamento por lamas ativas foram já testados, à escala laboratorial, nomeadamente:

- *nP* de prata [Choi, 2008];
- *nP* de dióxido de titânio [Kiser, 2009].
- *nP* de cobre [Ganesh, 2010];
- nanotubos de carbono [Luongo, 2010];
- *nP* de óxido de zinco [Zheng, 2011].

Os efeitos inibitórios de *nP* de prata nos microrganismos integrantes de um sistema de lamas ativadas foram estudados por Choi. Para desenvolver este estudo foi utilizada uma cultura microbiológica de bactérias autotróficas nitrificantes com um tempo de retenção de sólidos de 20 dias e um tempo de retenção hidráulica de 1 dia. Foram testadas três concentrações de prata (0,1; 0,5 e 1,0 mg/L), nas formas iônica ( $\text{Ag}^+$ ), coloidal ( $\text{AgCl}$ ) e de *nP*. Os resultados obtidos, na presença da maior concentração de *nP*, revelaram inibições no crescimento das bactérias nitrificantes na ordem dos  $42 \pm 7\%$ ,  $46 \pm 4\%$  e  $86 \pm 3\%$ , respetivamente. Choi verificou, assim, que a prata na forma de *nP* provoca maior inibição nas bactérias responsáveis pelo processo de nitrificação [Choi, 2008]. Imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM – *Scanning Electron Microscopy*) e por microscopia eletrónica de transmissão (TEM – *Transmission Electron Microscopy*) demonstraram que as *nP* de prata se ligam às células microbianas causando fragilidade na parede celular, o que sugere que este tipo de bactérias é particularmente suscetível à presença da prata na forma de *nP* e que a acumulação deste nanomaterial terá um efeito de deterioração nos microrganismos presentes num sistema de tratamento de águas residuais por lamas ativadas.

Kiser debruçou-se sobre a remoção de *nP* de  $\text{TiO}_2$  numa ETAR e posterior libertação para o meio hídrico [Kiser, 2009]. O autor verificou que as *nP* de  $\text{TiO}_2$  têm afinidade com os sólidos sendo a maioria, 70 a 85%, removida por sorção pela biomassa com uma concentração de sólidos entre 2000 e 3000 mg/L. No entanto, o autor verificou a presença de *nP* de  $\text{TiO}_2$ , na ordem dos 10 a 100  $\mu\text{g/L}$ , no efluente a ser descarregado na linha de água, afirmando que se trata de uma gama de concentrações relevante do ponto de vista ambiental, justificando um estudo da toxicidade deste nanomaterial nos organismos. O facto do mecanismo de remoção das *nP* de  $\text{TiO}_2$  ser a sorção aos biosólidos, que posteriormente poderão ser utilizados na agricultura, revela um novo meio de entrada no meio ambiente, com possíveis consequências do ponto de vista ecotoxicológico.

Ganesh avaliou a toxicidade e a remoção de *nP* de cobre e de cobre iónico na biomassa de um sistema de lamas ativadas [Ganesh, 2010]. Aquando da sua recolha, o sistema de lamas ativadas apenas era responsável pela oxidação do carbono uma vez que estava em *bypass* de amónia. O tempo de retenção das lamas utilizadas era de aproximadamente 1,2 dias e a concentração de sólidos suspensos totais foi de 650 mg/L. Os testes foram efetuados de modo a manter as condições de funcionamento da ETAR. Os resultados obtidos revelam que mais de 90% do cobre, na forma de nanopartículas, foi removido, contrariamente ao cobre iónico que obteve uma percentagem de remoção entre os 35 e os 70%. Os mecanismos de remoção verificados para as *nP* em estudo, para além da bioadsorção, foram agregação e posterior deposição; enquanto para os iões de cobre o mecanismo de remoção foi por precipitação. Verificou-se ainda que uma concentração de 10 mg/L de cobre iónico é tóxica para os microrganismos coliformes e para os oxidantes de amónia, no entanto, igual concentração de *nP* de cobre não apresenta quaisquer efeitos tóxicos para a biomassa. Também este estudo demonstra que, embora a substância em causa

seja a mesma, os seus efeitos irão depender da forma em que ela se encontra, nomeadamente na forma de *nP* ou na forma iónica.

Luongo estudou a toxicidade dos nanotubos de carbono de múltiplas paredes (*nTCMP*, do inglês) num sistema de tratamento por lamas ativadas [Luongo, 2010]. O estudo baseou-se na verificação da inibição da respiração dos microrganismos presentes nas lamas ativadas e da capacidade de proteção dos microrganismos por parte das substâncias poliméricas extracelulares (SPE), resultantes da secreção natural das bactérias, à toxicidade dos *nTCMP*. Foram analisadas as lamas nas condições em que foram recolhidas e, em simultâneo, efetuaram um segundo ensaio mas com as lamas submetidas a um processo de cisalhamento, de modo a libertarem SPE. O autor verificou que a taxa de respiração diminuiu com o aumento da concentração de *nTCMP*, sendo que a taxa de respiração mais baixa se verificou quando a suspensão de lamas ativadas foi exposta à maior concentração de *nTCMP*, concluindo que a toxicidade deste nanomaterial num sistema de lamas ativadas dependerá da dose a que estes estão expostos. Relativamente às SPE, concluiu-se que funcionam como substâncias protetoras dos microrganismos contra a toxicidade das *nTCMP*. Esta conclusão deve-se ao facto das lamas submetidas ao processo de cisalhamento libertarem SPE durante este processo, tendo-se verificado uma inibição da respiração superior nestes ensaios relativamente à dos ensaios com lamas não sujeitas a cisalhamento. A maioria das SPE contém uma mistura heterogénea de grupos funcionais que possuem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas [Jorand, 1998]. Há estudos que referem que estas espécies podem desenvolver interações hidrofóbicas [Wilen, 2003]. Assim, especula-se que as SPE existentes nos flocos de lamas ativadas poderão interagir e adsorver os *nTCMP*, evitando que estes penetrem mais para o interior dos flocos, onde se encontram a maioria dos microrganismos, reduzindo assim a sua toxicidade [Luongo, 2010].

A influência da presença de *nP* de ZnO na remoção de nutrientes (azoto e fósforo) num sistema de tratamento por lamas ativadas bem como o *stress* oxidativo causado na biomassa foram estudados por Zheng [Zheng, 2011]. Nestes ensaios utilizaram-se lamas ativadas sintéticas, preparadas em laboratório, com um tempo de retenção de 22 dias. Foram testadas três concentrações de ZnO (1, 10 e 50 mg/L), os resultados obtidos mostraram que a eficiência da remoção de azoto total diminuiu com o aumento da concentração de *nP*. As concentrações de fósforo no efluente passaram a ser detetáveis na presença das *nP* sugerindo que a presença de *nP* de ZnO induz a diminuição da remoção de fósforo. Os autores descobriram que a inibição da remoção dos nutrientes provocada pela presença de *nP* de ZnO se deve à libertação de iões zinco resultante da dissolução das *nP* e ao aumento da produção de espécies reativas de oxigénio. Estas espécies têm um efeito inibitório nas enzimas responsáveis pela remoção de azoto e de fósforo nas respetivas bactérias, corroborando os resultados obtidos.



## 1.5. Regulamentação

A experiência com as anteriores tecnologias emergentes provocou uma crescente procura por uma abordagem governamental, onde a I&D, inovação tecnológica e atenção aos aspetos de segurança e sociais têm de ser parte de um processo único com o objetivo de inovar "com responsabilidade", em benefício da sociedade. O crescimento sustentável é um dos pilares da Agenda Europa 2020 aprovado pela Comissão Europeia (Figura 1.9) e este pilar é orientar a discussão sobre a regulamentação da nanotecnologia a nível europeu [ObservatoryNANO, 2011].



Figura 1.9 – Os três pilares da estratégia europeia para 2020. Adaptado de [ObservatoryNANO, 2011].

No âmbito do 7º Programa-Quadro de I&DT, da Comissão Europeia, foi criado o projeto **observatoryNANO**. Este projeto teve uma duração de 4 anos, com início a 1 de Abril de 2008. A sua missão baseou-se na criação de um Observatório Europeu sobre nanotecnologias que fornecesse suporte contínuo e independente para os decisores, tendo em conta as metodologias desenvolvidas e validadas no decorrer do projeto, bem como as funções e atividades de outras iniciativas semelhantes.

A 17 de junho de 2008 a Comissão das Comunidades Europeias emitiu a comunicação COM(2008) 366 final ao Parlamento Europeu, ao Conselho e ao Comité Económico e Social Europeu referindo os **“Aspectos Regulamentares dos Nanomateriais”**. Este documento reflete o compromisso assumido nas suas comunicações publicadas anteriormente, são elas:

- Na comunicação COM(2004) 338 final, de 12-05-2004, intitulada **“Para uma estratégia europeia sobre nanomateriais”** a Comissão afirma que a avaliação e a investigação científica de possíveis riscos para a saúde e para o ambiente associados às nanotecnologias devem acompanhar a I&D e o progresso tecnológico [COM338, 2004].
- A comunicação COM(2005) 243 final, de 07-06-2005, denominada de **“Nanociências e Nanotecnologias: Plano de ação para a Europa 2005-2009”** especificava que todas as aplicações e utilizações das nanociências e das nanotecnologias devem respeitar o elevado nível de proteção da saúde pública, da segurança, dos consumidores, dos trabalhadores e do ambiente decidido pela Comunidade [COM243, 2005].

O âmbito destas comunicações abrange os nanomateriais atualmente em produção e/ou já colocados no mercado, não sendo considerados os nanomateriais ou nanopartículas que ocorrem naturalmente ou que são produzidos involuntariamente, nomeadamente, durante a combustão.

A Comunicação relativa aos aspetos regulamentares dos nanomateriais refere *“o desafio que a aplicação da legislação e a utilização dos instrumentos regulamentares criados pela legislação continuam a ser. Os documentos que fundamentam a aplicação da legislação, especialmente em matéria de avaliação de riscos, adotados no contexto da legislação presentemente em vigor terão de ser revistos, para assegurar que abordam efetivamente os riscos associados aos nanomateriais e utilizam da melhor forma a informação disponibilizada. Do mesmo modo, as autoridades e as agências terão de prestar especial atenção aos riscos relacionados com os nanomateriais sempre que a sua produção e comercialização estiverem sujeitas a um controlo prévio à colocação no mercado. Para se poder desenvolver, alterar e, em especial, aplicar a legislação de forma adequada, tem de ser melhorada a base do conhecimento científico.”* Este documento tem como foco de atenção tanto a legislação e a sua aplicação, como a necessidade de colmatar as lacunas em matéria de conhecimentos. Neste contexto, reforça a importância do Código de conduta para uma investigação responsável no domínio das nanociências e das nanotecnologias publicado pela Recomendação da Comissão COM(2008) 424 final, de 7-02-2008.

No que concerne a regulamentação relativa à proteção do ambiente a mais relevante no contexto dos nanomateriais será, de acordo com a COM(2008) 366 final, a prevenção e controlo integrados da poluição (PCIP), o controlo dos perigos associados a acidentes graves que envolvem substâncias perigosas (Seveso II), a Diretiva-Quadro relativa à água e uma série de diretivas relativas aos resíduos.

A Diretiva 2008/1/CE (PCIP), de 15 de janeiro de 2008, abrange, aproximadamente, 52 000 instalações industriais em todo o território da UE e exige que as instalações abrangidas pelas suas disposições funcionem em conformidade com um sistema de licenças que inclui valores-limite de emissão baseados na aplicação das melhores técnicas disponíveis (MTD). A Comissão das Comunidades Europeias considera que esta diretiva pode ser usada para controlar os impactos ambientais dos nanomateriais e as questões relativas aos nanomateriais nas instalações PCIP, mediante a inclusão dessas considerações no processo do Documento MTD de Referência (BREF – *Best Available Technologies Reference Documents*) da Comissão, caso venha a ser necessário.

A Diretiva Seveso II (96/82/CE), de 9 de dezembro de 1996, aplica-se a estabelecimentos onde estejam presentes substâncias designadas perigosas (ou substâncias que pertençam a determinadas categorias de classificação) acima de determinadas quantidades (ou limiares). Impõe uma obrigação geral aos operadores de tomarem todas as medidas necessárias para evitar acidentes graves e limitar as suas consequências para o Homem e para o Ambiente. No âmbito da diretiva, e caso se determine que certos nanomateriais apresentam perigos de acidentes graves, é possível classificá-los, em conjunto com os limiares apropriados.

A Diretiva-Quadro 2000/60/CE, de 23 de outubro de 2000, relativa à água, estabelece princípios comuns e um enquadramento geral para as medidas destinadas a melhorar o ambiente aquático, nomeadamente quanto a reduzir gradualmente a poluição provocada por substâncias prioritárias e suprimir gradualmente as emissões, descargas e perdas de substâncias perigosas prioritárias para a água. Em 2001 foi estabelecida uma lista das 33 substâncias prioritárias. A Comissão afirma que os nanomateriais podem ser incluídos entre essas substâncias prioritárias consoante as suas propriedades perigosas. Nesses casos, seriam propostas normas de qualidade ambiental pela Comissão. Para as águas subterrâneas, os Estados-Membro terão de estabelecer normas de qualidade relativamente aos poluentes que representem riscos, pelo que, nesse caso, os nanomateriais podem também ser incluídos.

Relativamente aos resíduos, a Diretiva 2006/12/CE define o quadro geral e impõe aos Estados-Membros a obrigação de assegurarem que o tratamento dos resíduos não afeta de forma adversa a saúde pública e o ambiente. A diretiva relativa aos resíduos perigosos define quais os resíduos perigosos e institui disposições mais rigorosas relativamente a esse tipo de resíduos. Os resíduos perigosos devem apresentar determinadas propriedades e figurar como perigosos na Lista Europeia de Resíduos. A Comissão considera que os resíduos que contenham nanomateriais podem ser classificados como perigosos se o nanomaterial apresentar propriedades relevantes que tornem o resíduo perigoso.

No ano de 2010, o observatoryNANO emitiu um relatório com o objetivo de dar uma visão geral da situação existente, as iniciativas de regulação e normas para as nanotecnologias a nível nacional e internacional, e para destacar as principais questões relevantes para a regulamentação das nanotecnologias [ObservatoryNANO, 2010]. Através deste relatório verifica-se que alguns países europeus tomaram a iniciativa, aprovando e publicando os seus próprios documentos regulamentares, como são os casos da Alemanha, Áustria, França, Itália, Noruega, Países Baixos, Reino Unido e Suíça. O elemento-chave na criação destes documentos foi o código de conduta da comunidade europeia para uma investigação responsável na área da nanociência e nanotecnologia. Daqueles ressaltam preocupações com a segurança, saúde e ambiente e também com aspetos éticos, legais e sociais das nanotecnologias.

No entanto, apesar do vasto interesse nesta área, a atitude das entidades reguladoras, da Comissão Europeia e de outras partes interessadas baseia-se na adaptação de diplomas já existentes às propriedades dos nanomateriais e na adoção de sistemas de autorregulação. Assim sendo, a chamada nano-regulamentação é ainda rara.

No relatório n.º 3 do observatoryNANO referente a 2011 encontram-se descritos os desafios que têm dificultado a regulamentação das nanotecnologias, são eles:

- A variedade de materiais e aplicações que se englobam no termo *nanotecnologias*;
- O limitado conhecimento sobre a toxicidade dos nanomateriais em sistemas vivos e sobre o seu transporte neste tipo de sistemas e em sistemas ambientais;
- A natureza dos proprietários da informação (ex. entidades privadas) que poderá dificultar o acesso à informação;
- A falta de padrões de orientação harmonizados e,
- Os assuntos relacionados com a classificação dos nanomateriais, como por exemplo a sua definição e a distinção quando comparados com as respetivas macro-substâncias.

Paralelamente a estas tentativas por parte da Comunidade Europeia, a Organização Internacional de Normalização (ISO) criou, em 2005, um Comité Técnico (TC 299) destinado ao campo das nanotecnologias. Este Comité dividiu o seu trabalho em 4 grupos:

- JWG1 – Terminologia e nomenclatura
- JWG2 – Medição e caracterização
- WG3 – Saúde, segurança e aspetos ambientais das nanotecnologias
- WG4 – Especificações

Foram já publicadas 19 normas ISO referentes a nanotecnologias, incluindo terminologia e definições e estão em desenvolvimento mais 25 que, embora não obrigatórias, poderão constituir um contributo valioso na exploração da nanotecnologia. O estudo continuado deste

tema permitirá o desenvolvimento da regulamentação a nível europeu e posterior transposição para legislação nacional, uma vez que as normas se encontram na base da pirâmide regulamentar representada na figura 1.10.



Figura 1.10 – Pirâmide regulamentar. Adaptado de [ObservatoryNANO, 2011].

# Capítulo 2 : Materiais e Métodos

Neste capítulo apresentam-se as características das  $nP$ , do inoculo e dos meios sintéticos utilizados, bem como a descrição dos métodos analíticos e instrumentais seguidos e das condições de funcionamento dos reatores implementados.



## 2.1. Nanopartículas

Como já se referiu, as tintas aquosas contém nanopartículas poliméricas na sua formulação, com diâmetros e composições variadas.

Para este trabalho escolheu-se usar como composto modelo nanopartículas de poli(metacrilato de butilo), 100% reticuladas e emulsionadas em água.

As *nPBMA* foram produzidas por polimerização em emulsão de metacrilato de butilo (em descontinuo), com adição de 2% (molar, face ao monómero) de dimetacrilato de etilenoglicol enquanto agente reticulante. Utilizou-se ainda um surfatante aniónico para estabilizar a emulsão - dodecilsulfato de sódio.

A caracterização destas nanopartículas por dispersão de luz dinâmica (DLS – *Dynamic Light Scattering*) (ver ponto 2.5.5) revelou apresentarem um diâmetro hidrodinâmico médio ( $D_m$ ) de 52,8 nm, com uma variância relativa (v.r.) de 0,0044 e um erro quadrático médio (e.q.m.) de  $2,6 \times 10^{-4}$ . Ensaio de cromatografia de permeação gel (GPC – *Gel Permeation Chromatography*) (ver ponto 2.5.2) permitiram comprovar que as nanopartículas estavam completamente reticuladas. O teor de sólidos da emulsão de *nPBMA* produzida é de 6,8% (p/p).

A concentração de *nPBMA* utilizada nos vários ensaios foi de 30 mg/L. Este valor foi definido com base na informação de Brar que refere que a concentração de tintas que chega a uma ETAR é de 0,09 a 0,36 mL *per capita* anual [Brar, 2010].

## 2.2. Inoculo

O inoculo utilizado foi obtido a partir das lamas provenientes da ETAR de Setúbal, localizada na Quinta da Cachofarra, em Praias do Sado, cujo processo se encontra descrito no ponto 1.3.

As amostras de lamas ativadas foram recolhidas na recirculação do tanque de arejamento (pois é o local onde a sua concentração é mais elevada) num recipiente de plástico, previamente lavado com as próprias lamas, com uma capacidade total de 5 L, que não foi completamente cheio em nenhuma das recolhas. Durante o transporte até ao laboratório foram acondicionadas num saco térmico e em contacto com gelo. No laboratório foram mantidas na solução original e no frigorífico a aproximadamente 4°C. Foram utilizadas lamas frescas em cada um dos ensaios realizados.

A preparação da solução de lamas ativadas a utilizar nos ensaios iniciou-se por uma



centrifugação da amostra recolhida a 12000 rpm durante 10 minutos. Após esta operação, o sobrenadante foi descartado, as lamas foram ressuspensas em água e novamente centrifugadas, nas mesmas condições. Estas operações foram repetidas até que o sobrenadante estivesse límpido. Após descartar o sobrenadante, pesaram-se  $\approx 15$  g de lamas húmidas que posteriormente foram ressuspensas em 4 L de água, sendo esta a solução-mãe a utilizar nos ensaios. Depois da secagem de uma amostra de lamas, determinou-se uma concentração final de lamas secas de  $\approx 3$  g/L.

## 2.3. Meios sintéticos

Os ensaios realizados foram preparados com dois meios sintéticos de constituição distinta: um para os testes respirométricos e outro para os reatores biológicos.

O meio sintético utilizado nos testes respirométricos foi preparado de acordo com o método 209 [OCDE, 2010].

Na tabela 2.1. descreve-se a preparação do meio sintético utilizado nos reatores biológicos.

Tabela 2.1 – Constituição de 10 L do meio sintético utilizado nos reatores biológicos: soluções base e respetivas quantidades. Adaptado de [Barreiros, 2003].

Solução	Volume (mL)
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 22,50g/L	15
Cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 36,43 g/L	15
Cloreto de ferro hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0,250g/L	15
Oligoelementos <ul style="list-style-type: none"> <li>Sulfato de manganês tetrahidratado (<math>\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}</math>) 0,060g/L</li> <li>Ácido bórico (<math>\text{H}_3\text{BO}_3</math>) 0,040g/L</li> <li>Sulfato de zinco heptahidratado (<math>\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math>) 0,032g/L</li> <li>Quelato de ferro e sódio (<math>\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FeN}_2\text{NaO}_8 \cdot 3\text{H}_2\text{O}</math>) 0,100g/L</li> </ul>	15
Fonte de fósforo <ul style="list-style-type: none"> <li>Dihidrogenofosfato de potássio anidro (<math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>) 8,5g/L</li> <li>Hidrogenofosfato de potássio anidro (<math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math>) 21,75g/L</li> <li>Hidrogenofosfato de sódio heptahidratado (<math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math>) 33,40g/L</li> <li>Cloreto de amónio anidro (<math>\text{NH}_4\text{Cl}</math>) 1,70g/L</li> </ul>	100
Fonte de azoto <ul style="list-style-type: none"> <li>Cloreto de amónio anidro (<math>\text{NH}_4\text{Cl}</math>) 76,41g/L</li> </ul>	100
Fonte de carbono <ul style="list-style-type: none"> <li>Acetato de sódio trihidratado (<math>\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}</math>) 113,4g/L</li> </ul>	200

Os meios foram sempre autoclavados a 110°C durante 15 minutos. Todos os reagentes utilizados tinham grau de pureza p.a..

## 2.4. Métodos analíticos

Para verificar os efeitos da presença de *n*PBMA na eficiência do sistema de lamelas ativadas foram seguidas cinéticas de consumo de C e N, através dos métodos analíticos descritos em seguida.

### 2.4.1. Determinação da carência química de oxigénio

O oxigénio necessário para degradar quimicamente a matéria orgânica presente nos reatores biológicos em estudo, parâmetro conhecido por carência química de oxigénio (CQO), foi determinado através da adição, em excesso, de um oxidante forte, o dicromato de potássio (Roig Farma S.A. p.a.); a matéria orgânica foi digerida durante 1 hora a 148°C, num digestor VELP-SCIENTIFICA DK20, em meio ácido, na presença de sulfato de mercúrio (II) (Panreac p.a.) e de um catalisador de prata - sulfato de prata (Sigma-Aldrich p.a.). Após a digestão, para determinar o excesso de dicromato de potássio, procedeu-se à sua titulação com uma solução de sulfato ferroso amoniacal 0,25 mol/L (Pronalab, p.a.). O ponto de equivalência foi determinado pela adição de um indicador de ferroína (HiMedia, p.a.). A precisão deste método, para amostras com 200 mg/L de CQO e na ausência de ião cloreto é  $\pm 13$  mg  $O_2$ /L e, para amostras contendo 160 mg  $O_2$ /L de CQO e 100 mg/L de ião cloreto é de  $\pm 14$  mg  $O_2$ /L [AWWA, 1999].

### 2.4.2. Determinação do ião amónio

Este parâmetro foi determinado através do método de Nessler [ASTM D1426-B]. Para tal, foi traçada uma reta de calibração a partir de 7 padrões com concentrações na gama de 0 a 2,0 mg N/L. Esta reta apresenta um coeficiente de correlação linear de  $r^2 = 0,9989$  sendo a relação entre a absorvência (Abs) e a concentração (Conc.) de ião amónio expressa em mg N/L dada pela equação (2.1).

$$Abs = 0,1544 Conc - 0,0032 \quad (2.1)$$

Os padrões foram preparados a partir de uma solução-mãe de cloreto de amónio 10 mg N/L (Scharlau p.a.). A 50 mL de cada um dos padrões foram adicionadas 2 gotas de solução de hidróxido de sódio 250 g/L (98% EKA) de modo a corrigir o pH para 10,5. Posteriormente adicionaram-se 2 gotas de solução de tartarato de sódio e potássio 300 g/L (Scharlau p.a.) para prevenir turvações, 1 mL de reagente de Nessler (solução alcalina de tetraiodomercurato (II) de potássio) e agitou-se. Passados 20 minutos leu-se a absorvência de cada padrão no espectrofotómetro referido no ponto 2.5.1, a um comprimento de onda de 425 nm, numa célula de vidro de 1 cm, utilizando como solução de referência água desionizada [AWWA, 1999].

Para a determinação do ião amónio nas amostras procedeu-se de modo idêntico ao efetuado para os padrões.

A precisão do método para concentrações de íão amónio superiores a 0,5 mg/L é  $\pm 0,04$  [AWWA, 1999]. Os limites de deteção e quantificação são, respetivamente 2,5 e 5,3 mg N/L.

### 2.4.3. Determinação do íão nitrito

O íão nitrito foi determinado através da formação de um azocorante rosa produzido pela reação de uma solução de sulfanilamida 10 g/L (Sigma p.a.) com uma solução de diclorato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (NED) 1 g/L (Riedel-de Haën p.a.). Traçou-se uma reta de calibração recorrendo a 10 padrões com concentrações na gama de 0 a 200 µg N/L cujo coeficiente de correlação linear obtido foi de 0,9998. A equação (2.2) traduz a relação entre a concentração de íão nitrito, expresso em mg N/L, e a absorvência a um comprimento de onda de 540 nm.

$$Abs = 0,0036 Conc + 0,0034 \quad (2.2)$$

Os padrões utilizados foram preparados a partir de uma solução de nitrito de sódio 1 mg N/L (Panreac p.a.). Foram pipetados os volumes necessários desta solução de modo a obter as concentrações dos padrões para balões volumétricos de 50 mL. Adicionou-se 1 mL da solução de sulfanilamida e aguardou-se 10 minutos, agitando os balões de vez em quando. Em seguida adicionou-se 1 mL da solução de NED, aguardou-se 20 minutos, continuando a agitar os balões de vez em quando. Aferiram-se os balões volumétricos com água desionizada e a absorvência de cada um foi lida no espectrofotómetro, através de uma célula de vidro de 1 cm a 540 nm. A solução de referência utilizada foi idêntica à dos métodos anteriores, água desionizada. Para as amostras o procedimento foi idêntico substituindo os volumes de solução de nitrito de sódio por volumes adequados de amostra. A precisão deste método é  $\pm 0,005$  mg/L [AWWA, 1999]. Os limites de deteção e quantificação calculados são 0,3 e 1 mg N/L, respetivamente.

### 2.4.4. Determinação do íão nitrato

O íão nitrato foi determinado através do kit Palintest®, método 163/P. Este método baseia-se na redução do íão nitrato a nitrito através da adição de pó de zinco e de uma pastilha (Nitratest Tablet), o princípio é idêntico ao descrito no ponto 2.4.3 para a determinação do íão nitrito estando, neste caso, os reagentes necessários disponíveis na forma de pastilhas. As absorvências foram lidas no espectrofotómetro, a um comprimento de onda de 570 nm, numa célula de vidro de 1 cm, utilizando como solução de referência água desionizada.

Também aqui se traçou uma reta de calibração através das absorvências obtidas para padrões com concentrações de 2 a 18 mg N/L, a gama do teste. O coeficiente de correlação linear obtido para a relação entre a absorvência lida a 570 nm dada pela equação (2.3) foi 0,9945.

$$Abs = 0,0483 \cdot Conc - 0,0011 \quad (2.3)$$

Para obter a concentração de íão nitrato, expressa em mg N/L, é necessário subtrair a concentração de íão nitrito, também expressa em mg N/L, determinada pelo método descrito no ponto 2.4.3. Os limites de detecção e quantificação calculados são, respetivamente, 41 e 67 mg N/L.

#### 2.4.5. Determinação dos sólidos suspensos

Os sólidos suspensos foram determinados de acordo com [AWWA, 1999]. Foram filtrados 10 mL de amostra através de filtros de fibra de vidro GF – 6 da Macherey-Nagel, com uma porosidade de 600 nm e com o auxílio de uma bomba de vácuo GAST modelo DOA-P504-PN. Os filtros foram previamente secos numa estufa National Appliance Company modelo 5851, arrefecidos no exsicador e pesados numa balança METTLER TOLEDO PB303 até à obtenção de peso constante. Para a determinação dos sólidos suspensos voláteis (SSV) foi utilizada uma mufla VULCAN A-550 NEY. A determinação dos SST decorreu a uma temperatura entre 103º - 105ºC e a determinação do SSV a 550ºC. Para o cálculo dos SST e dos SSV foram utilizadas as equações 2.4 e 2.5, respetivamente.

$$SST \text{ (mg/L)} = \frac{(P_2 - P_1) \times 10^6}{V_a} \quad (2.4)$$

$$SSV \text{ (mg/L)} = \frac{(P_2 - P_3) \times 10^6}{V_a} \quad (2.5)$$

Em que

$P_1$  – massa do filtro seco, g

$P_2$  – massa do filtro + amostra após estufa, g

$P_3$  – massa do filtro + amostra após mufla, g

$V_a$  – volume de amostra, mL

## 2.5. Métodos instrumentais

No desenvolvimento do trabalho experimental foram utilizadas as técnicas descritas em seguida.

### 2.5.1. Espectrofotometria de ultravioleta-visível

Para determinação das absorvências já referidas anteriormente utilizou-se um espectrofotômetro de duplo feixe UV-Vis Evolution 160, da marca Thermo Scientific.

### 2.5.2. Cromatografia de permeação gel

A cromatografia de permeação gel (GPC – *Gel Permeation Chromatography*), também conhecida por cromatografia de exclusão por tamanhos, é um dos métodos atualmente mais utilizados na determinação de distribuições de pesos moleculares em amostras poliméricas. A técnica experimental assemelha-se muito à cromatografia líquida de alta resolução (HPLC – *High Precision Liquid Chromatography*), embora a separação da amostra se faça de acordo com os volumes hidrodinâmicos (que se relacionam com os pesos moleculares dos constituintes), em vez das diferentes afinidades destes pelo enchimento. Uma coluna de exclusão é formada por um substrato inerte e poroso, onde as dimensões dos poros se encontram muito bem definidas. No caso da GPC utiliza-se um gel poroso como substrato.

Nesta técnica, a amostra a analisar é injetada numa coluna previamente estabilizada pela passagem de um eluente. A introdução de um soluto origina um gradiente de concentrações nos poros do gel, induzindo a difusão das moléculas para o seu interior. A contínua passagem de eluente inverte o gradiente, originando uma segunda etapa em que as moléculas do soluto abandonam os poros do enchimento. Como não existem interações entre o soluto e o enchimento, o tempo de permanência de uma molécula num poro apenas depende do seu *volume hidrodinâmico*: uma partícula maior penetra menos nos orifícios, sendo portanto mais facilmente removida; pelo contrário, partículas pequenas entram e saem dos poros com uma enorme facilidade, envolvendo-se em vários processos de difusão, o que retarda a sua eluição.

O *volume de retenção* de um componente ( $V_e$ ), definido pelo volume de eluente que passou pela coluna até à saída de uma determinada fração é, pois, função do respetivo volume hidrodinâmico e, conseqüentemente, do peso molecular (mantendo-se a temperatura e o caudal constantes). Pode, portanto, fazer-se uma curva de calibração para cada polímero, injetando amostras monodispersas de cadeias idênticas com peso molecular conhecido e medindo os respetivos  $V_e$ . O peso molecular de uma nova amostra é depois estimado com base na concentração relativa de polímero a cada  $V_e$ . Caso a estrutura dos padrões coincida com a das amostras, determinam-se os pesos moleculares absolutos; caso contrário, obtêm-se pesos moleculares relativos, geralmente a padrões de poliestireno.

O sistema GPC utilizado encontra-se esquematicamente representado na figura 2.1. É constituído por um reservatório, onde se armazena o eluente; uma bomba peristáltica, responsável por lhe criar movimento a um caudal constante; um injetor, por onde se introduz a amostra; uma ou mais colunas, responsáveis pela separação; e dois detetores, que monitorizam a saída dos componentes já separados.

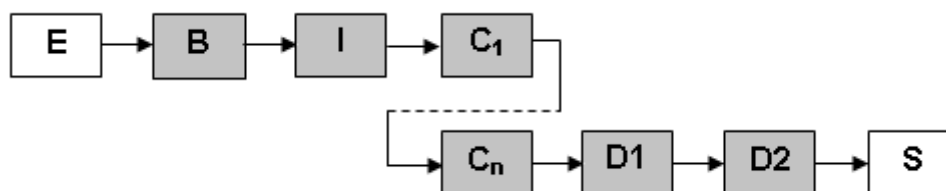


Figura 2.1 – Constituição esquemática do sistema de GPC utilizado.

E – reservatório com eluente; B – Bomba peristáltica; I – Injetor; C1 a Cn – Colunas; D1 – Detetor de índice de refração; D2 – Detetor de índice Dispersão de Luz Dinâmica; S – Fluxo de saída.

É importante que o eluente contido no reservatório não contenha quaisquer partículas sólidas ou bolhas de ar, para uma boa qualidade de resultados e proteção do equipamento (colunas e detetores). Torna-se, portanto, necessário filtrar previamente tanto o eluente como as próprias amostras com membranas de 220 nm.

A bomba, Waters 510, retira o eluente do reservatório e fá-lo circular no sistema a caudal constante. Esta bomba permite a seleção de caudais compreendidos entre 0,1 e 9,9 ml/min (Waters, 1990). Neste trabalho utilizou-se tetrahydrofurano, THF, como eluente, a um caudal de 0,8 mL/min. Quando o movimento do eluente através do sistema atinge o estado estacionário, insere-se a amostra pelo injetor Waters U6K. O volume de injeção fica definido pela capacidade do *loop* que lhe está adaptado. Utilizou-se um *loop* de 250  $\mu$ L no traçado de todos os cromatogramas apresentados neste trabalho [Waters, 1988]. As amostras passam em seguida por duas colunas montadas em série (Waters HR5 and Phenomenex 10<sup>4</sup>), sendo depois encaminhadas para um detetor de dispersão de luz (Wyatt miniTREOS) e, por fim, para um detetor de índice de refração (Waters 2410).

A partir do valor de variação do índice de refração do polímero com a variação da concentração ( $dn/dC = 0,048$ ), é o software do próprio aparelho que determina os valores dos pesos moleculares das cadeias, dispensando-se o traçado da curva de calibração.

### 2.5.3. Microscopia ótica

Para uma visualização rápida e com menor ampliação dos microrganismos existentes nas lamas ativadas foi utilizado um microscópio Novex Holland K-Range com uma ocular de ampliação 10x e uma objetiva de 40x, obtendo-se imagens com ampliações de 400x.

#### 2.5.4. Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (AFM – *Atomic Force Microscopy*) permite obter imagens reais, em três dimensões, representativas da topografia das superfícies, com uma resolução espacial que se aproxima das dimensões atômicas. Para a obtenção de imagens topográficas dos microrganismos em análise foi utilizado um microscópio Nanosurf easySCAN 2 FlexAFM, com uma resolução de 20 nm. Foi efetuado o varrimento da superfície da amostra utilizando uma sonda sensível à força (sensor de força), que consiste numa ponta de dimensões atômicas integrada num braço em movimento (*cantilever*), neste caso específico foram utilizadas pontas simétricas de silício monolítico (*budgetsensor* Tap 190A1-G) com raio nominal inferior a 10 nm, constante de força nominal de 48 N/m e frequência de ressonância nominal de 190 kHz. À medida que se aproxima da superfície da amostra, a ponta interage com os seus átomos e moléculas, causando a deflexão do braço. Esta deflexão é medida através da mudança de direção (angular) de um feixe laser emitido por um fotodiodo de estado sólido e refletido pelo braço de AFM, sendo o feixe laser refletido captado por um fotodetetor de fendas. A sonda de AFM segue os contornos da superfície. Durante a deslocação da ponta pela superfície o computador analisa, em cada posição na superfície, a força de interação entre a ponta e a amostra e traça um diagrama de alturas, reconstruindo a topografia da amostra [Paquim, 2009]. Na figura 2.2 encontra-se representado o princípio de funcionamento de um microscópio de força molecular. As medidas foram feitas em modo oscilante (*tapping mode*).

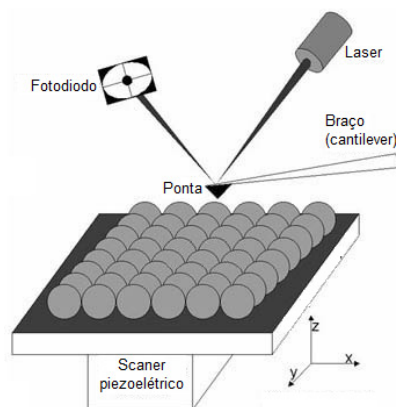


Figura 2.2 – Esquema de funcionamento de um microscópio de força atômica. Adaptado de [Science in your eyes, 2012].

#### 2.5.5. Dispersão de luz dinâmica

As técnicas de dispersão de luz permitem determinar distribuições de raios *de giracão* (no caso da dispersão de luz estática) e de raios *hidrodinâmicos* (dispersão de luz dinâmica) em assembleias de partículas suspensas num dado solvente. A figura 2.3 descreve esquematicamente a constituição do equipamento de dispersão de luz dinâmica (DLS – *Dynamic Light Scattering*) utilizado.

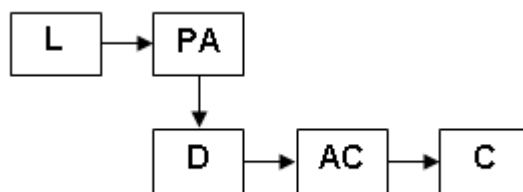


Figura 2.3 – Constituição esquemática de um equipamento de DLS.

L – Laser de He-Ne, 35mW; PA – Porta-amostras; D – Detetor; AC – Autocorrelacionador; C – Computador.

A fonte de radiação corresponde a um laser de hélio-néon de 35 mW que produz um feixe de luz a  $\lambda = 632,8$  nm. Esta radiação é dirigida ao porta-amostras onde se coloca a amostra, imersa num banho termostatzado de decalina (decahidronaftaleno que, por ter um índice de refração muito semelhante ao do vidro, evita a ocorrência de reflexões e refrações). O detetor encontra-se montado sobre um goniómetro, permitindo efetuar leituras a diferentes ângulos de dispersão (embora, para medidas de DLS, se utilize apenas um ângulo, normalmente  $90^\circ$ ). Os valores obtidos pelo detetor seguem para o autocorrelacionador (onde é calculada a função de autocorrelação dos sinais) e deste para um computador, onde é efetuada a análise numérica da função de autocorrelação pelo método CONTIN [Ford, 1985].

O limite de deteção das *n*PBMA em estudo (isoladas) encontra-se na ordem das partes por bilião (ppb).

Todas as amostras sujeitas a DLS foram filtradas com membrana de 220 nm.



## 2.6. Reatores biológicos

Neste trabalho foram implementados três tipos diferentes de reatores biológicos: reatores descontínuos, reatores descontínuos sequenciais e reatores contínuos.

Os reatores descontínuos caracterizam-se por não existir, durante a reação biológica, nem alimentação de reagentes nem remoção de produtos. Neste tipo de reator, os reagentes são pré-misturados e a reação é conduzida por um período de tempo específico, após o qual a mistura reacional é removida, podendo ser conduzida para processos específicos de separação dos produtos dos reagentes e/ou submetida a diversos métodos analíticos para verificar a composição final.

Os reatores descontínuos sequenciais (SBR – *Sequencing Batch Reactor*) caracterizam-se pelo facto das suas etapas de processo ocorrerem todas no mesmo equipamento, embora de uma forma sequencial. Estas etapas são: enchimento, reação, sedimentação, decantação, extração e podem ser conjugadas consoante o princípio de funcionamento pretendido.

Os reatores contínuos caracterizam-se pela adição de reagentes ao longo da operação e pela remoção contínua dos respetivos produtos da reação tendo sido usados, neste trabalho, para simular o tanque e decantador secundário de um processo de lamas ativadas que decorre numa ETAR.

### 2.6.1. Reatores descontínuos

Os reatores descontínuos implementados no decorrer deste projeto tinham uma capacidade de 1000 mL, tendo sido inicialmente carregados com o inóculo (descrito no ponto 2.2), a alimentação (meio sintético descrito no ponto 2.3) e a substância a testar (emulsão de *n*PBMA descrita no ponto 2.1) em várias concentrações (dentro da gama de concentrações com que estas partículas normalmente surgem nas ETAR [Brar, 2010]). Os reatores foram continuamente agitados através de agitadores magnéticos e arejados por difusão de ar com bomba de arejamento. Todos estes ensaios decorreram à temperatura ambiente.

Manteve-se uma concentração final de inóculo de 1,5 g/L, valor estipulado pela OCDE para os testes respirométricos [OCDE, 2010], também efetuados e que se descrevem em seguida.

Os testes respirométricos foram efetuados segundo o método n.º 209 – *Guidelines for the testing of chemicals*, da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Económico [OCDE, 2010].

Os ensaios decorreram à temperatura ambiente ( $\cong 25^{\circ}\text{C}$ ) e a  $\text{pH} = 7,5 \pm 0,5$ . As soluções utilizadas na sua preparação foram:

- Suspensão de *n*PBMA 6,8% teor de sólidos (substância a testar);

- Solução de 3,5-diclorofenol 100 mg/L (3,5-DCP), substância inibidora de referência;
- Solução de alitiourea 2,32 g/L (ATU), utilizada como inibidora específica da nitrificação;
- Solução de lamas ativadas 3 g/L;
- Meio sintético.

A constituição dos ensaios implementados em laboratório, para um volume final de 1L, encontra-se resumida na tabela 2.2. Realizaram-se 8 ensaios, a saber:

- Quatro concentrações diferentes de *n*PBMA (10, 30, 50 e 100 mg/L, ou seja T1, T2, T3 e T4, respetivamente);
- Dois ensaios em branco (B1 e B2);
- Dois ensaios com substância inibidora de referência com a solução 3,5-DCP (R1 e R2, com 7 e 30 mg/L 3,5-DCP, respetivamente);
- Um controlo abiótico, contendo *n*PBMA e 11,6 mg/L ATU (A).

Tabela 2.2 – Volumes utilizados nos vários ensaios referentes aos testes respirométricos, expressos em mL.

Ensaio Solução	T1	T2	T3	T4	A	B1/B2	R1	R2
<i>n</i> PBMA	0,146	0,436	0,740	1,460	1,460	-	-	-
3,5-DCP	-	-	-	-	-	-	70	300
ATU	-	-	-	-	5	5	-	-
Lamas ativadas	500	500	500	500	-	500	500	500
Meio sintético	32	32	32	32	32	32	32	32

O tempo de contacto dos microrganismos com a emulsão de *n*PBMA, nos ensaios efetuados, foi de 3 horas. Durante o tempo de contacto, as soluções foram arejadas através de bombas de arejamento e agitadas através de agitadores magnéticos, como representado na figura 2.4. Também a solução inicial de lamas ativadas foi continuamente arejada até ao início dos ensaios.



Figura 2.4 – Ensaio correspondente aos testes respirométricos, durante o tempo de contacto com a emulsão.

Terminadas as 3 horas, mediu-se o decaimento do OD em cada um dos ensaios, numa célula estanque com um medidor de oxigénio dissolvido WTW Oxi330i e respetivo eletrodo CelloX 325, representados na figura 2.5. Durante a medição a amostra estava a ser agitada através de um agitador magnético. Este decaimento foi seguido durante 15 minutos.



Figura 2.5 – Célula estanque para medição do OD.

Para cada um dos ensaios foram ainda determinados os sólidos suspensos totais (SST) por filtração, com bomba de vácuo GAST (modelo DOA-P504-BN), de 20mL de amostra através de um filtro de fibra de vidro com porosidade 0,6µm (Macherey-Nagel GF-6). Estes foram depois colocados, dentro de cadinhos de porcelana, na estufa (National Appliance, modelo 5851) durante 24h. Finalmente arrefeceram à temperatura ambiente, no exsiccador, até à obtenção de peso constante [AWWA, 1999].

Com os valores de OD e SST obtidos é possível calcular a taxa específica de respiração  $R_S$  dos microrganismos expostos a *n*PBMA, através da equação (2.6).

$$R_S = \frac{R}{C_{SST}} \quad (2.6)$$

Em que:

$R_s$  – Taxa específica de respiração,  $\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$

$R$  – Taxa de consumo de  $\text{O}_2$ ,  $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , calculada através da equação (2.7)

$C_{SST}$  – Concentração de SST, g/L

$$R = \frac{Q_1 - Q_2}{\Delta t} \times 60 \quad (2.7)$$

Onde:

$Q_1$  – Concentração de OD no início da medição, mg/L

$Q_2$  – Concentração de OD no final da medição, mg/L

$\Delta t$  – Intervalo de tempo em que decorreu a medição, min

### 2.6.2. Reatores descontínuos sequenciais

A instalação referente aos SBR, representada na figura 2.6, foi feita em duplicado: um reator destinado ao ensaio em branco e outro reator para um ensaio na presença de 30 mg/L de *n*PBMA.

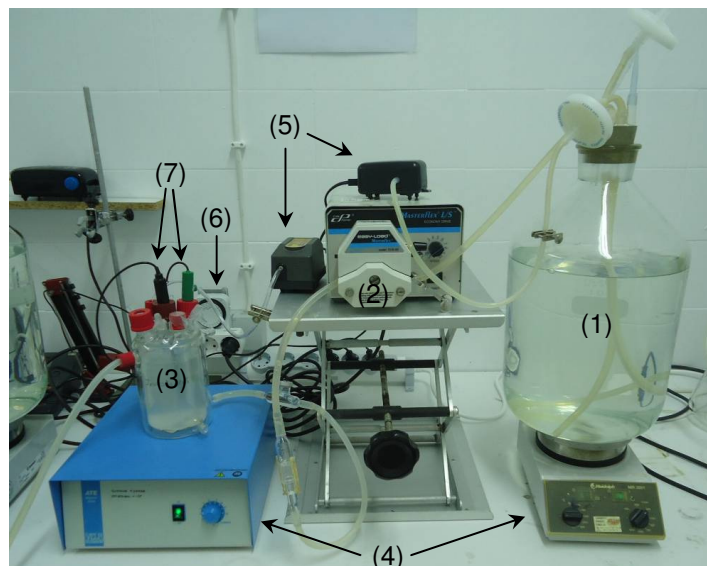


Figura 2.6 – Instalação de SBR.

(1) Alimentação; (2) bomba peristáltica; (3) reator; (4) placas de agitação magnética; (5) bombas de arejamento; (6) temporizador; (7) elétrodos de pH (verde) e temperatura (preto).

Cada uma das instalações consistiu num reator com uma capacidade de 500 mL,

contendo 50 mL da solução de lamas ativadas com uma concentração de 3 g/L, alimentado a um caudal de 250 mL/ciclo de 8 horas com efluente sintético, armazenado em frasco de vidro, através de uma bomba peristáltica (Masterflex L/S modelo 7518-00). O efluente sintético foi continuamente agitado através de um agitador magnético e arejado por difusão de ar com bomba de arejamento. As fases de cada um dos reatores encontram-se representadas na figura 2.7. e decorreram em ciclos com a duração de 8 horas, controlados por temporizadores elétricos. O tempo de retenção hidráulica nos reatores foi de 16,6 horas, semelhante ao  $t_{RH}$  do tanque de arejamento da ETAR de Setúbal (13,2 horas, ver ponto 2.2).

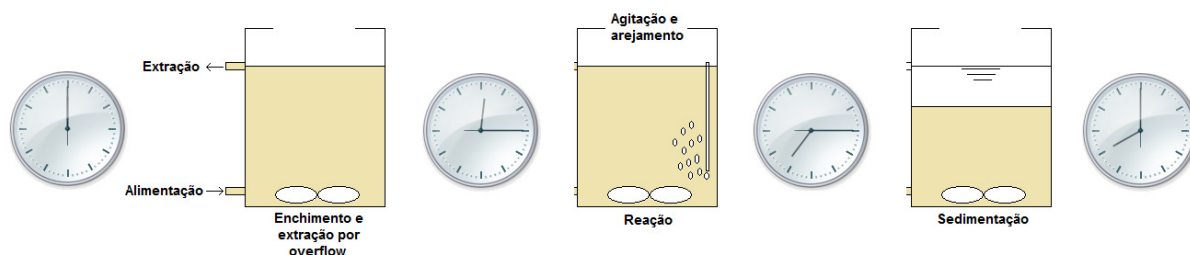


Figura 2.7 – Fases do SBR consideradas neste trabalho experimental.

A fase de alimentação dos reatores, com 250 mL de efluente sintético cada, decorreu durante os 15 minutos que antecederam as 7 horas de agitação e arejamento (fase de reação). Antes de nova alimentação, deixaram-se sedimentar as lamas durante 45 minutos. A saída do efluente do reator deu-se por transbordo (*overflow*).

O pH e a temperatura foram medidos utilizando um Microprocessor pH meter da HANNA instruments, com eletrodo de pH HI 1131B e sonda de temperatura HI 7669/2W. O OD foi monitorizado com o medidor portátil de oxigénio WTW Oxi 330i e respetivo eletrodo CellOx 325.

Enquanto um dos reatores foi alimentado apenas com o meio sintético (descrito no ponto 2.3), no outro adicionou-se 5 mL da emulsão de *n*PBMA ao efluente sintético da alimentação, correspondendo a uma concentração de 30 mg/L de *n*PBMA (que, como referido em 2.1, corresponde à gama de concentrações que chega às ETAR).

Uma vez que se utilizou uma solução inicial de lamas ativadas com uma concentração de 3 g/L e se fez uma diluição de 1:10, a concentração de lamas ativadas no interior dos reatores foi de 0,3 g/L.

### 2.6.3. Reatores contínuos

Para verificar o efeito da presença de *n*PBMA num sistema contínuo de lamas ativadas foi montada, no laboratório, a instalação constante na figura 2.8., referente a um reator contínuo com recirculação que simula o sistema de lamas ativadas existente numa ETAR.

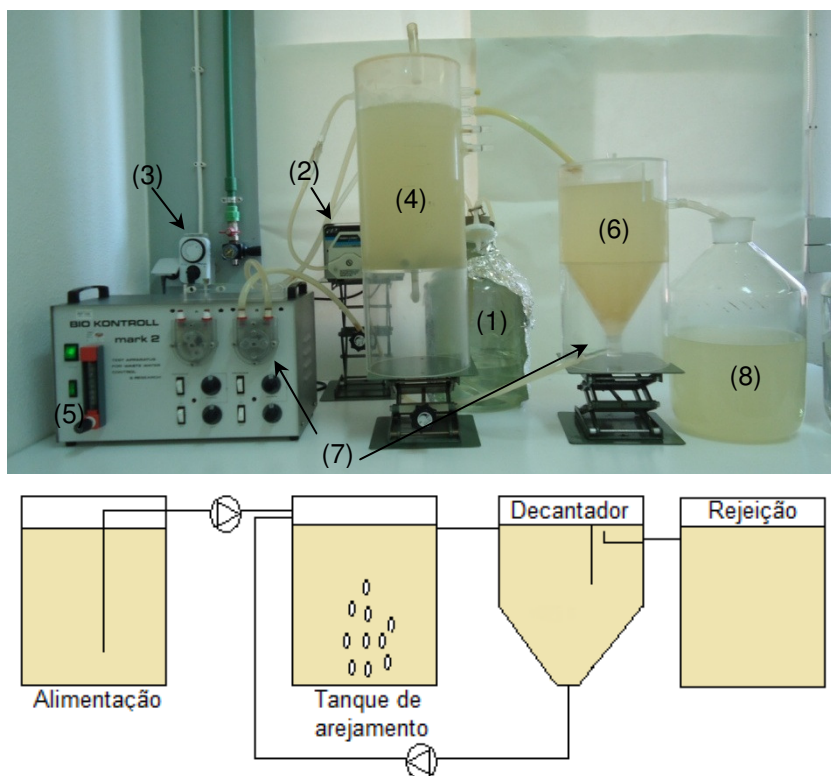


Figura 2.8 – Instalação de lamas ativadas.

- (1) Alimentação; (2) bomba peristáltica; (3) temporizador; (4) tanque de arejamento; (5) regulador de arejamento; (6) decantador; (7) circuito e bomba de recirculação; (8) efluente “tratado”.

Esta instalação era composta por um reator com 8 L de capacidade, que simulava um tanque de arejamento de uma ETAR, acoplado a um decantador de 5 L, simulando um decantador secundário. O reator foi inoculado com 800 mL da solução de lamas ativadas a 3 g/L, perfazendo uma concentração final de 0,3 g/L, tal como nos SBR. A alimentação de efluente sintético foi feita com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex L/S modelo 7518-00). O caudal de alimentação foi de 3312 mL/dia. O caudal de recirculação definido foi de 1872 mL/dia, o que representa uma taxa de recirculação  $r \cong 0,57$ . Não foi efetuada purga de lamas e o  $t_{RH}$  no tanque de arejamento foi de 2,4 dias. Este valor de  $t_{RH}$  é muito superior tanto aos valores de  $t_{RH}$  dos SBR como da ETAR. Para obter um valor semelhante ao dos SBR, cujo  $t_{RH}$  é 16,6 horas, seria necessário aumentar o caudal da alimentação aumentando assim o seu consumo. Este aumento no consumo de alimentação tornaria inviável a manutenção e a operação do sistema de lamas ativadas no laboratório.

O sistema foi alimentado com o meio sintético descrito no ponto 2.3 durante 33 dias. Após este período, passou a introduzir-se 30 mg/L de *n*PBMA no mesmo meio sintético, utilizado como alimentação do reator. O sistema funcionou com esta nova alimentação durante um período de 31 dias. No decorrer destes dois períodos foram sempre monitorizados parâmetros como pH, temperatura e OD da alimentação, do reator e do decantador; nos dois últimos foram também determinados os SST. Foram recolhidas amostras, nas duas etapas do sistema, da alimentação e da saída do decantador (rejeição), para posterior determinação de parâmetros como CQO, iões amónio, nitrito e nitrato.

# **Capítulo 3 :Tratamento e Discussão de Resultados**

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos nos vários ensaios e respectivas interpretações.





## 3.1. Estudos de agregação das *nP*

### 3.1.1. Em lamas brutas

Para verificar se já existiam outros tipos de *nP* nas lamas recolhidas na ETAR com dimensões semelhantes às das *nPBMA* em estudo e que eventualmente pudessem ser confundidas com as próprias *nPBMA* nos ensaios de DLS (que apenas monitorizam diâmetros hidrodinâmicos médios de partículas), efetuou-se um ensaio em branco, medindo por DLS uma lama diretamente recolhida na ETAR, apenas filtrada com uma membrana de 220 nm. Os resultados obtidos revelaram um número de contagens muito baixo o que significa que existem poucas partículas em suspensão capazes de provocar dispersão de luz. Esta técnica revelou ainda que as poucas partículas em suspensão (com diâmetros inferiores a 220 nm) teriam um diâmetro hidrodinâmico médio de  $\approx 19$  nm e uma variância relativa de 0,03 (medidas a que corresponde um erro médio quadrático de  $7,1 \times 10^{-4}$ ). Pelo facto do diâmetro médio das partículas em suspensão ser inferior ao das *nPBMA* em estudo e da variância relativa não ser muito elevada (parâmetro que mede a distribuição dos tamanhos entre partículas), pode-se concluir que não existem nas lamas brutas partículas em suspensão com dimensões semelhantes às *nPBMA*, pelo que esta técnica será adequada à monitorização da existência destas nanopartículas. O valor do erro médio quadrático (na ordem de  $10^{-4}$ ) revela um bom grau de confiança na qualidade do ajuste. Na figura 3.1 apresenta-se o histograma obtido para a distribuição das partículas em suspensão nas lamas brutas, filtradas a 220 nm, por dispersão de luz dinâmica.

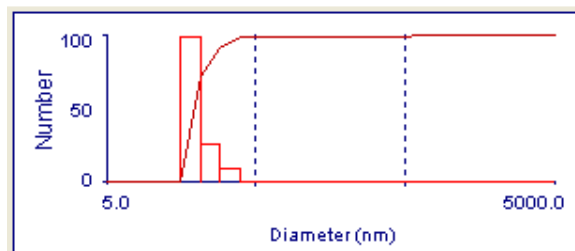


Figura 3.1 – Histograma da distribuição das partículas em suspensão nas lamas brutas ( $D_m = 19$  nm; v.r. = 0,03; e.m.q. =  $7,1 \times 10^{-4}$ ).

Não existindo outras partículas que pudessem ser confundidas com as *nP* em estudo passou-se à verificação do efeito que as lamas brutas em si poderiam ter nas *nPBMA*, uma vez que sua força iónica é forçosamente diferente do meio em que estas se encontravam emulsionadas. Para tal mediram-se por DLS duas amostras de lamas contendo 10 e 1000 mg/L de *nPBMA*, respetivamente. As amostras foram mantidas sob agitação durante 3 h, antes dos ensaios em DLS.

Na amostra de lamas contendo 10 mg/L de *nPBMA* os histogramas obtidos por DLS

revelaram novamente um baixo número de contagens, tendo sido contudo detetadas partículas com um  $D_m \cong 56$  nm, associado a uma v.r. de 0,24 e a um e.m.q. de  $6,4 \times 10^{-4}$ . O baixo número de contagens indica a existência de um baixo número de partículas em suspensão. Contudo, o valor do diâmetro médio das partículas corresponde ao das *nP* isoladas (dentro do erro experimental), o que nos leva a concluir a sua presença. O facto de não se terem detetado agregados nesta amostra não significa que este processo não tenha ocorrido. Aliás, o baixo número de contagens deverá significar que a grande maioria das nanopartículas ou terá sido degradada pelos microrganismos, ou terá ficado retida na membrana de 220 nm, quer por ter formado agregados com diâmetros superiores a este valor, quer por se ter sorvido à população microbiana das lamas (ver ponto 1.3).

As medidas efetuadas com a amostra com 1000 mg/L de *nPBMA* revelaram a existência de partículas com um  $D_m \cong 47$  nm (v.r. = 0,07 e e.m.q. =  $6,1 \times 10^{-4}$ ). O sinal de DLS continuou a ser fraco, o que indica que não deverão estar a ser detetadas todas as *nP* inicialmente adicionadas às lamas. Mais uma vez, algumas poderão ter formado grandes agregados e outras ter sido sorvidas pelos microrganismos ou mesmo por partículas de maiores dimensões existentes nas lamas e ficado retidas na membrana, para além de não se poder excluir a hipótese de degradação das *nP* pela população microbiana, tal como na situação anterior.

Na tabela 3.1. encontra-se um resumo dos resultados obtidos para verificação do efeito das *nPBMA* nas lamas brutas.

Tabela 3.1 – Testes de lamas brutas com diferentes concentrações de *nPBMA*.

Amostra	$D_m$ (nm)	Variância relativa	Erro médio quadrático	Observações
Ensaio em branco	19	0,03	$7,1 \times 10^{-4}$	Sinal muito fraco (36,1 kcps*)
Lamas ativadas com 10 mg/L de <i>nPBMA</i>	56	0,24	$6,4 \times 10^{-4}$	Sinal fraco (64,7 kcps*)
Lamas ativadas com 1000 mg/L de <i>nPBMA</i>	47	0,07	$6,1 \times 10^{-4}$	Sinal fraco (60,6 kcps*)

\* kcps: milhares de contagens por minuto

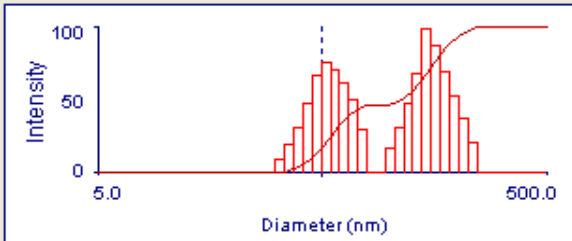
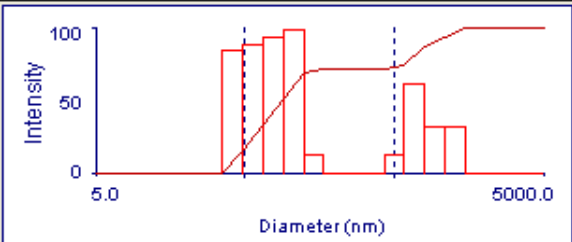
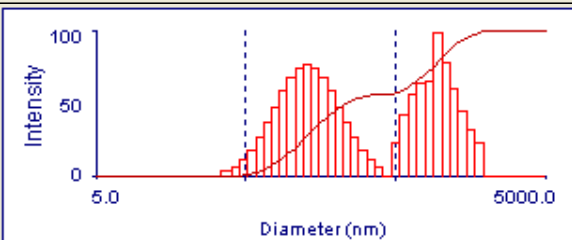
Em suma, nestes testes verificou-se que, quando em contacto com as lamas ativadas brutas, continuam a observar-se *nPBMA* isoladas em suspensão (apesar de existir uma fração que sofre outros processos – seja agregação, sorção à população microbiana ou degradação pelos microrganismos).

Pelo facto de existirem partículas isoladas em suspensão nas condições reais de um tanque de lamas ativadas, conclui-se ser pertinente estudar a influência destas *nP* na eficiência deste processo.

### *3.1.2. No meio sintético*

Uma vez que os ensaios foram efetuados em meio sintético inoculado com a população microbiana do tanque de lamas ativadas da ETAR de Praias do Sado, torna-se necessário efetuar um ensaio em branco prévio colocando as *nP* no próprio meio mineral. Com este ensaio pretende verificar-se se, ao adicionar *nPBMA* ao meio, as nanopartículas continuam isoladas no interior dos reatores, ou sofrem agregação já que, nesta última situação, não estaríamos a estudar o efeito do PBMA à escala nano, mas a escalas superiores. Para tal estudou-se uma amostra do meio utilizado para alimentação dos reatores biológicos estudados, com uma concentração de 30 mg/L das *nPBMA*, ao longo do tempo, por dispersão de luz dinâmica. Esta amostra foi agitada e arejada entre medidas, tal como sucedeu durante a alimentação dos reatores. As medidas de DLS foram realizadas ao fim de 9 h, 29 h e 53 h, sem filtrar a amostra. Passadas 9 h após a adição das *nP* ao meio sintético obteve-se um histograma com uma distribuição bimodal que indica a existência de partículas com diâmetros médios na ordem dos 50 e dos 100 nm, revelando a presença de *nPBMA* isoladas e também de agregados. Após 29 h, continua a obter-se uma distribuição bimodal indicativa de *nPBMA* isoladas ( $D_m \cong 50$  nm) e de agregados com um diâmetro hidrodinâmico médio de 600 nm. Ao fim de 53 h existem ainda algumas *nPBMA* isoladas ( $D_m \cong 50$  nm) e agregados de diversos diâmetros e alguns com diâmetro médio superior a 600 nm. Na tabela 3.2. estão resumidos os resultados obtidos ao longo do tempo.

Tabela 3.2 – Histogramas obtidos por medidas de dispersão de luz dinâmica ao meio mineral contendo 30 ppm de *n*PBMA, ao longo do tempo.

t (h)	Histograma	Observações
9		Distribuição bimodal; existem <i>n</i> PBMA isoladas ( $D_m \cong 50$ nm) e agregados ( $D_m \cong 100$ nm) em solução. nº contagens = 65,00 kcps
29		Distribuição bimodal; existem <i>n</i> PBMA isoladas ( $D_m \cong 50$ nm) e agregados ( $D_m \cong 600$ nm) em solução. nº contagens = 83,75 kcps
53		Distribuição bimodal; existem algumas <i>n</i> PBMA isoladas ( $D_m \cong 50$ nm) e agregados de diversos diâmetros em solução. nº contagens = 80,45 kcps

Conclui-se que o próprio meio sintético promove a agregação das *n*P ao longo do tempo, já que a dimensão média dos agregados vai aumentando com esta variável. De salientar, contudo, que existe sempre uma fração significativa de *n*P que permanecem isoladas. Assim, nestas condições (arejamento e agitação) o meio mineral permite a existência de *n*PBMA isoladas.

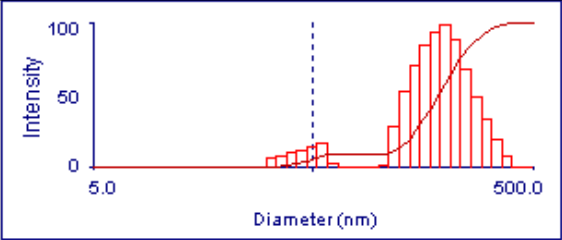
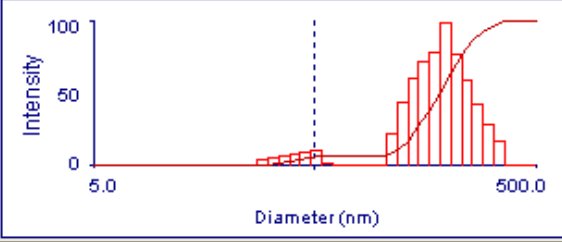
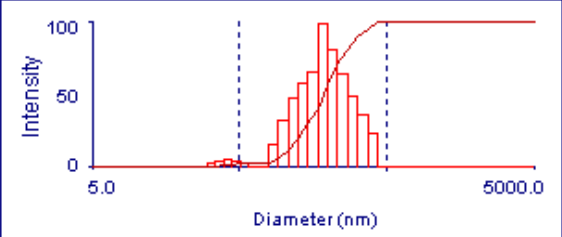
### 3.1.3. Numa solução de lamelas ativadas e meio sintético

Foram montados dois reatores descontínuos com uma concentração de lamelas ativadas de 3 g/L contendo, respetivamente, 10 e 100 mg/L de *n*PBMA e retiradas amostras ao fim de 3 h, 6 h e 9 h, para serem observadas por DLS com o objetivo de averiguar o estado de agregação das *n*PBMA. Nas tabelas 3.3 e 3.4 encontram-se os resultados obtidos ao longo do tempo nas amostras contendo 10 e 100 mg/l de *n*PBMA, respetivamente.

A análise da amostra de 10 mg/L (tabela 3.3), ao fim de 3 horas, revelou um histograma com uma distribuição bimodal, mostrando a presença de *n*PBMA livres ( $D_m \cong 54$  nm) e de agregados ( $D_m \cong 200$  nm) em suspensão. De salientar o baixo número de contagens (41,85 kcps) que, como já se referiu, revela um baixo número de partículas dispersoras de luz em suspensão. Passadas 6 horas continuou a verificar-se a presença de *n*PBMA livres ( $D_m \cong 54$  nm) assim como agregados ( $D_m \cong 192$  nm), continuando a observar-se um número de

contagens baixo (86,28 kcps), resultado semelhante ao obtido passadas apenas 3 horas. Ao fim de 9 horas, em que o número de contagens continuava baixo (72,20 kcps), continuam a ser detetadas *nP* livres ( $D_m \cong 60$  nm) e agregados ( $D_m \cong 214$  nm). Embora a dimensão dos agregados não tenha variado muito ao longo deste período de tempo, a proporção entre agregados e nanopartículas livres aumentou mais um pouco, indicando a continuação do processo de agregação. Considerando os resultados obtidos nos ensaios preliminares com o meio sintético (em que, ao fim de 53 horas, se verificavam ainda *nPBMA* isoladas em suspensão assim como agregados de diversos tamanhos), neste ensaio, ao fim de 3 h a proporção de *nPBMA* isoladas em suspensão é muito menor que a de agregados.

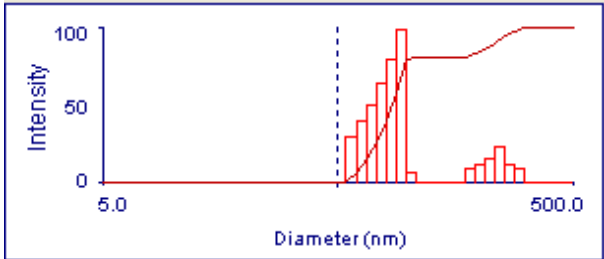
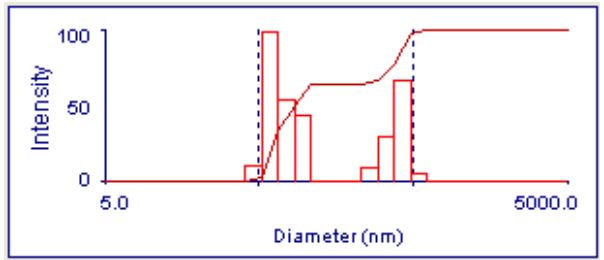
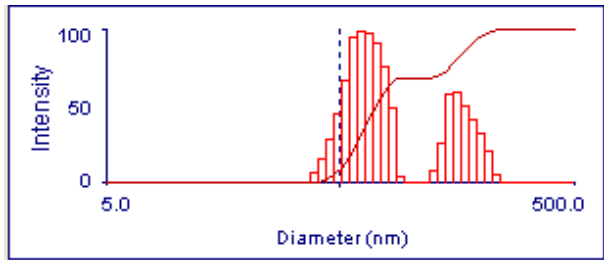
Tabela 3.3 – Histogramas obtidos por medidas de dispersão de luz dinâmica a amostras recolhidas do reator descontínuo a operar com 10 mg/L de *nPBMA*.

t (h)	Histograma	Observações
3		Distribuição bimodal; existem <i>nPBMA</i> isoladas ( $D_m = 54$ nm) e agregados ( $D_m = 200$ nm) em solução. nº contagens = 41,85 kcps
6		Distribuição bimodal; existem <i>nPBMA</i> isoladas ( $D_m = 54$ nm) e agregados ( $D_m = 192$ nm) em solução. nº contagens = 86,28 kcps
9		Distribuição bimodal; existem algumas <i>nPBMA</i> isoladas ( $D_m = 60$ nm) e agregados ( $D_m = 214$ nm) em solução. nº contagens = 72,20 kcps

A análise da amostra retirada do reator contendo 100 mg/L de *nPBMA*, cujos resultados se encontram na tabela 3.4, revela que, ao fim de 3 h, existem *nP* livres ( $D_m \cong 61$  nm) e também sob a forma de agregados ( $D_m \cong 177$  nm); inicialmente esta amostra apresentava um número de contagens demasiado elevado para obter uma boa medição, razão pela qual foi diluída até se obter um número de contagens de  $\cong 200$  kpcs (o que revela um elevado número de partículas em suspensão). Os resultados obtidos na amostra passadas 6 horas são semelhantes aos obtidos na amostra referente às 3 horas, assim como os obtidos ao fim de 9 h: continuam a existir *nPBMA* isoladas ( $D_m \cong 60$  nm) e agregadas ( $D_m \cong 154$  nm), com

dimensões aproximadamente constantes. O facto do número de contagens ser muito superior significa que a concentração de *n*PBMA em suspensão no interior do reator também é muito maior (100 mg/L).

Tabela 3.4 – Histogramas obtidos por medidas de dispersão de luz dinâmica a amostras recolhidas do reator descontínuo a operar com 100 mg/L de *n*PBMA.

t (h)	Histograma	Observações
3		Distribuição bimodal; existem <i>n</i> PBMA isoladas ( $D_m = 61$ nm) e agregados ( $D_m = 177$ nm) em solução. $n^\circ$ contagens $\cong 200$ kcps
6		Distribuição bimodal; existem <i>n</i> PBMA isoladas ( $D_m = 61$ nm) e agregados ( $D_m = 175$ nm) em solução. $n^\circ$ contagens $\cong 200$ kcps
9		Distribuição bimodal; existem <i>n</i> PBMA isoladas ( $D_m = 60$ nm) e agregados ( $D_m = 154$ nm) em solução. $n^\circ$ contagens $\cong 200$ kcps

Estes resultados indicam que a presença da população microbiana favorece a agregação das nanopartículas. Isto porque, comparativamente à situação descrita no ponto 3.1.2., em que se utilizou o mesmo meio sintético (mesmas características químicas, hidrodinâmicas, etc.) a atividade microbiana será a única razão para se verificar uma maior agregação. Salienta-se, no entanto, que embora a agregação das nanopartículas esteja favorecida na presença dos microrganismos, continuam a existir *n*PBMA isoladas em suspensão.

## 3.2. Reatores descontínuos

Foram efetuados vários ensaios em reatores descontínuos, destinados a estudos de diversos fatores:

- Ensaio respirométricos;
- Estudo da integridade da estrutura química das *nPBMA*;
- Estudo da morfologia da superfície dos microrganismos contidos nas lamas ativadas após exposição às *nPBMA*.

Os resultados obtidos encontram-se descritos nos subcapítulos seguintes.

### 3.2.1. Ensaio respirométricos

O consumo de oxigénio por parte dos microrganismos foi medido durante 15 min, numa célula estanque, após 3 h de contacto entre os microrganismos e as *nPBMA*, como já referido no ponto 2.4.1. Aos resultados obtidos nestas medições aplicaram-se as equações (2.6) e (2.7) e calcularam-se as taxas de respiração específicas para cada concentração de *nPBMA* testada. Os resultados obtidos estão representados na figura 3.2.

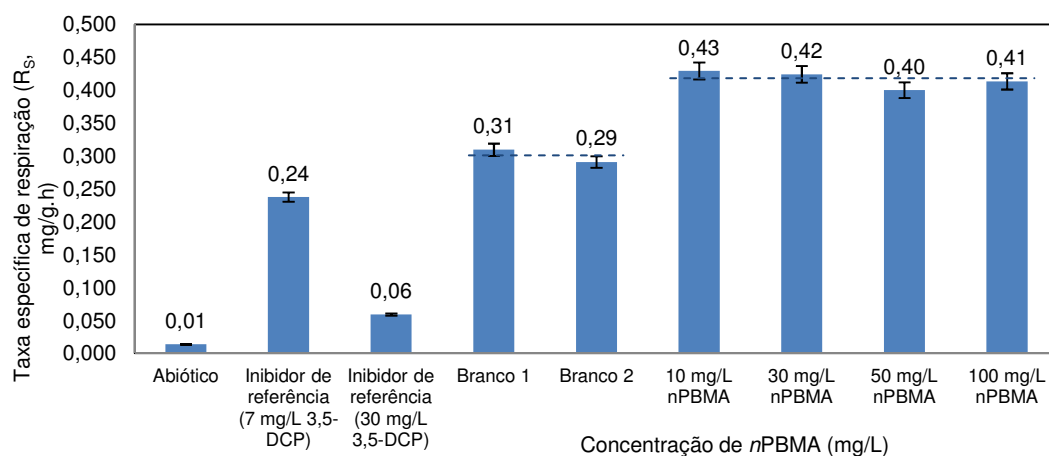


Figura 3.2 – Taxa específica de respiração de acordo com a concentração de *nPBMA*.

(erro relativo  $\pm 3\%$ ; ----- valores médios de  $R_s$ )

O resultado obtido no ensaio abiótico revela contaminação do tubo de arejamento devido a uma utilização prévia, uma vez que não foi adicionado inoculo a este ensaio. Os ensaios contendo 7 e 30 mg/L da solução inibidora de referência 3,5 – DCP, respetivamente, revelam, a sensibilidade do inoculo a esta substância. Verifica-se que quanto maior a concentração de substância inibidora menor é a taxa de respiração específica, comprovando que tanto as condições do método como a sensibilidade do inoculo (lamas ativadas) são fiáveis no dia da exposição (OECD, 2010).



Relativamente aos ensaios de teste, verifica-se que, quando expostos a *nPBMA*, a taxa de respiração específica dos microrganismos é superior à dos ensaios em branco, o que significa que o consumo de oxigénio aumenta, facto que poderá estar relacionado com uma situação de *stress*. O aumento da respiração metabólica leva a um aumento da produção de espécies reativas de oxigénio que poderão originar uma situação de *stress* oxidativo [Gandara, 2012], indicando que, neste caso, os microrganismos terão ficado mais suscetíveis pela presença de *nP*.

Surpreendentemente verifica-se que este aumento parece ser, ainda, independente da concentração de *nPBMA* adicionada, dentro do erro experimental. A linha, a tracejado, representada na figura corresponde ao valor médio da taxa de respiração específica na presença de *nPBMA*,  $0,42 \pm 0,01$  mg/g.h.

### *3.2.2. Estudo da integridade da estrutura química das nPBMA após contacto com os microrganismos*

As amostras submetidas a dispersão de luz dinâmica (10 e 100 mg/L *nPBMA*) foram posteriormente liofilizadas e dissolvidas em THF, um bom solvente para as cadeias poliméricas de PBMA. Esta solução foi filtrada com uma membrana de 220 nm (consoante o procedimento descrito no ponto 2.5.2) e injetada num sistema de cromatografia de permeação gel.

No cromatograma obtido, representado na figura 3.3., não se observa qualquer banda – apenas são visíveis linhas de base. Se a estrutura polimérica das *nP* tivesse sido corrompida, ao dissolver a amostra num bom solvente, as cadeias livres (formadas pelo ataque químico às *nP* reticuladas) passariam a membrana e seriam visíveis no cromatograma, através de bandas correspondentes aos seus diferentes pesos moleculares. Pelo contrário, o cromatograma obtido apenas revelou linhas de base. Deve-se, assim, concluir que a estrutura das *nPBMA* não foi alterada pelo que, quando submetidas à presença do THF, as *nP* apenas incharam, aumentando o seu volume hidrodinâmico e, por conseguinte, tendo ficado retidas no filtro de 220 nm. Conclui-se, deste modo, que em nenhuma das amostras (10 e 100 mg/L) se verificou uma degradação da estrutura reticulada das *nPBMA*, o que significa que os microrganismos não têm capacidade para degradar quimicamente as *nPBMA*.

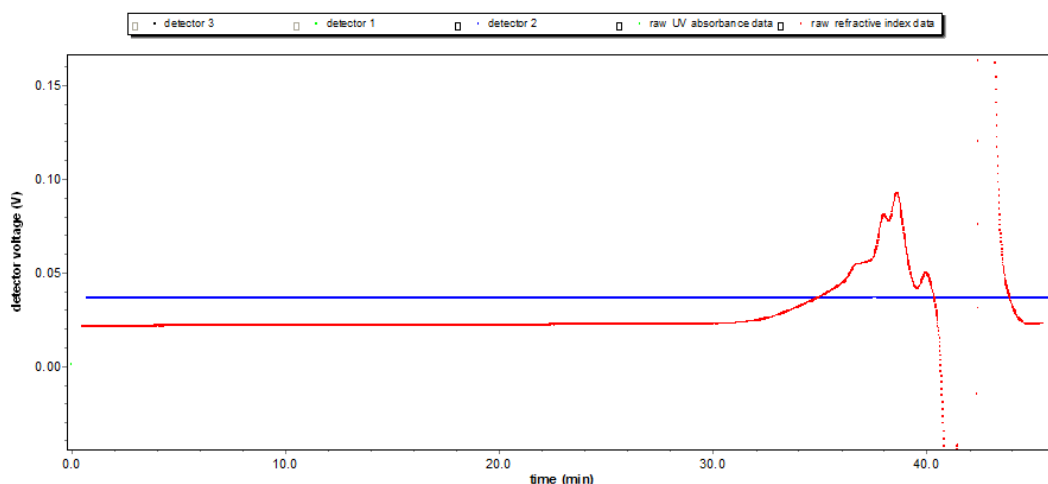


Figura 3.3 – Cromatograma obtido após a injeção da amostra com 10 mg/L *n*PBMA.  
(azul: detetor de dispersão de luz dinâmica; vermelho: detetor de índice de refração)

### 3.2.3. Estudo da morfologia da superfície dos microrganismos contidos nas lammas ativadas após exposição às *n*PBMA

No ponto 3.1.1 verificou-se que o número de contagens no traçado do histograma no DLS era muito baixo, revelando a ausência de uma fração significativa das *n*PBMA, ou por agregação seguida de precipitação, ou por sorção aos microrganismos (já que a hipótese de degradação das nanopartículas foi excluída através dos ensaios feitos por GPC). Para tal analisaram-se três amostras de microrganismos: os microrganismos em suspensão no ensaio em branco – reator descontínuo sem adição de *n*PBMA (amostra 1); os do reator descontínuo contendo 30 mg/L de *n*PBMA que se encontravam em suspensão (amostra 2) e, os microrganismos que se iam acumulando ao longo do tempo na parede deste reator (amostra 3), acima da linha da superfície das lammas, conforme se indica na figura 3.4. As amostras foram recolhidas após 6:30 h do início dos ensaios, foram depositadas sobre micas e a água evaporada com um leve fluxo de argon.

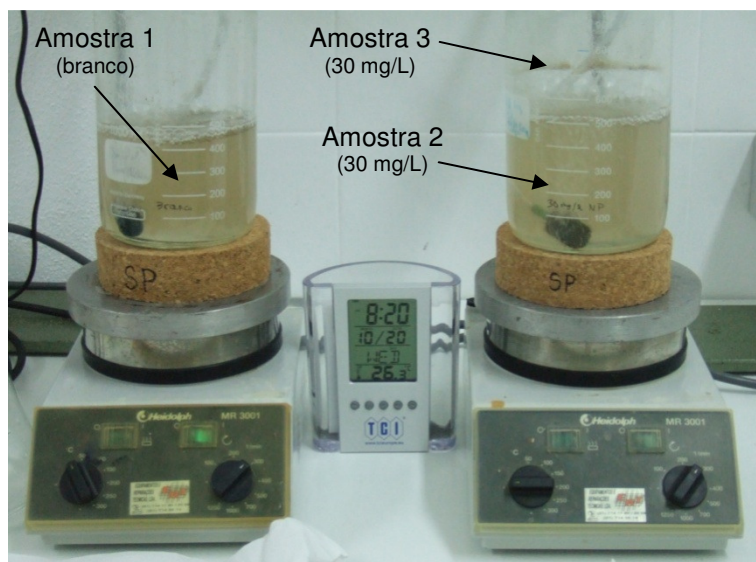


Figura 3.4 – Zonas de recolha das amostras de microrganismos nos reatores descontínuos para análise por AFM.

A técnica de AFM, descrita no ponto 2.5.4, permite caracterizar superfícies e, portanto, verificar se as *nP* que não se encontram em suspensão estão, de alguma forma, associadas à superfície dos microrganismos. Para verificar essa ocorrência observaram-se vários microrganismos recolhidos em cada uma das zonas acima referidas por AFM. É de salientar a diversidade de microrganismos existentes nas lamas ativadas (cultura mista) pelo que, seguramente, nem todas as espécies de microrganismos foram observadas.

Na amostra referente ao ensaio em branco (amostra 1) não se esperava encontrar qualquer vestígio das *nP* em estudo. Foram observados vários tipos de microrganismos, identificando-se irregularidades esféricas apenas na superfície de uma das filamentosas observadas (figura 3.5a). Após sucessivas ampliações verificou-se que os diâmetros destas esferas (assinaladas na figura 3.5b) eram superiores a 100 nm, pelo que não poderiam ser confundidas com as *nPBMA* que eventualmente pudessem estar presentes em microrganismos das amostras seguintes.

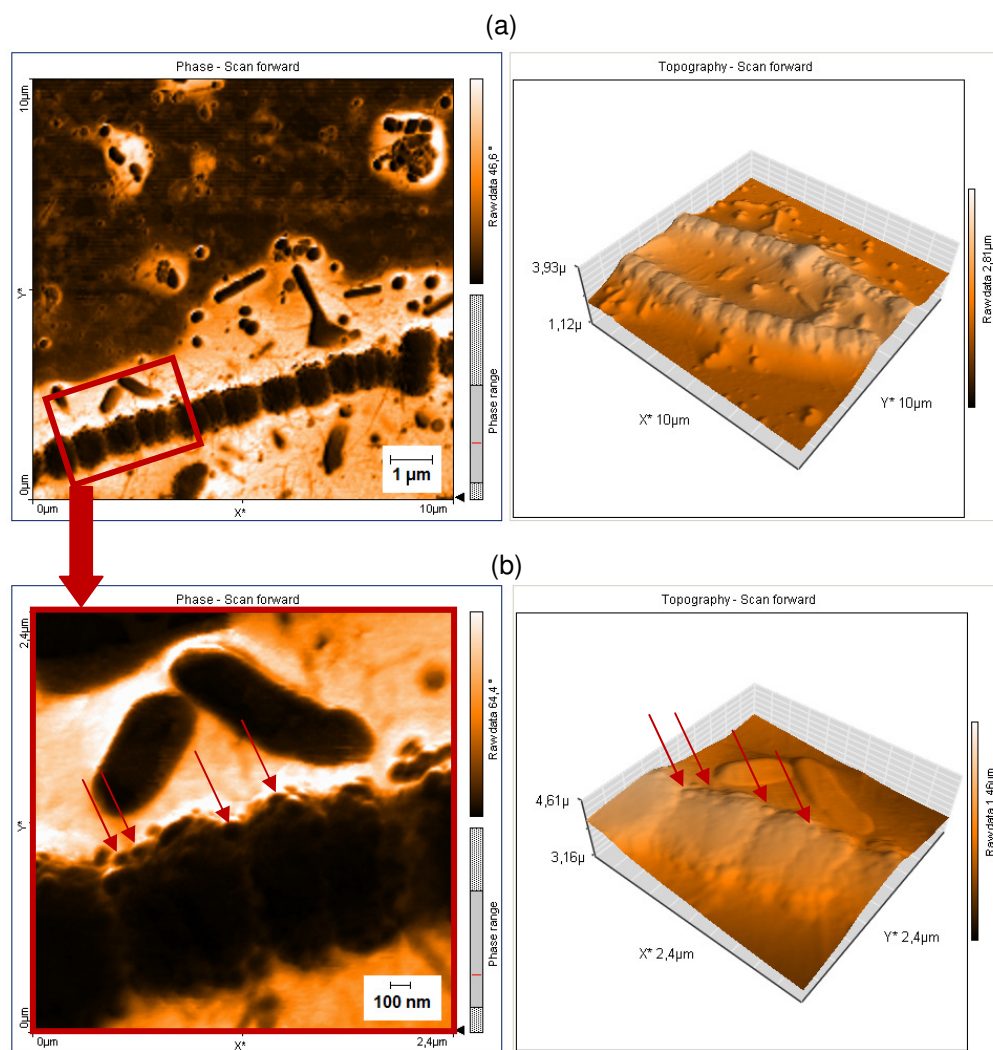


Figura 3.5 – Imagens de AFM (esquerda imagem obtida em *fase*; direita: reconstrução topográfica) de um microrganismo presente no ensaio em branco<sup>1</sup>, **(a)** varrimento a 10 µm x 10 µm; **(b)** ampliação das zonas marcadas com retângulos vermelhos no varrimento (a) a uma escala de 2,4 µm x 2,4 µm.

Estas imagens servem de referência para uma posterior deteção de *nPBMA* nas amostras recolhidas do reator contendo 30 mg/L de *nP*.

Na amostra 2, recolhida no reator contendo 30 mg/L de *nPBMA*, foram também observados vários microrganismos com topografias diferentes, como seria de esperar numa cultura mista. Vários destes microrganismos foram observados por AFM em busca de esferas que pudessem corresponder às *nP*. Na figura 3.6(a) apresentam-se as imagens recolhidas num

<sup>1</sup> Imagens traçadas pelo Prof. José Paulo Farinha (CQFM – IST)

dos microrganismos observado e que não revelava quaisquer irregularidades esféricas na sua superfície; pelo contrário, na figura 3.6(b), apresentam-se imagens de outro microrganismo em que já era possível observar irregularidades com esta forma.

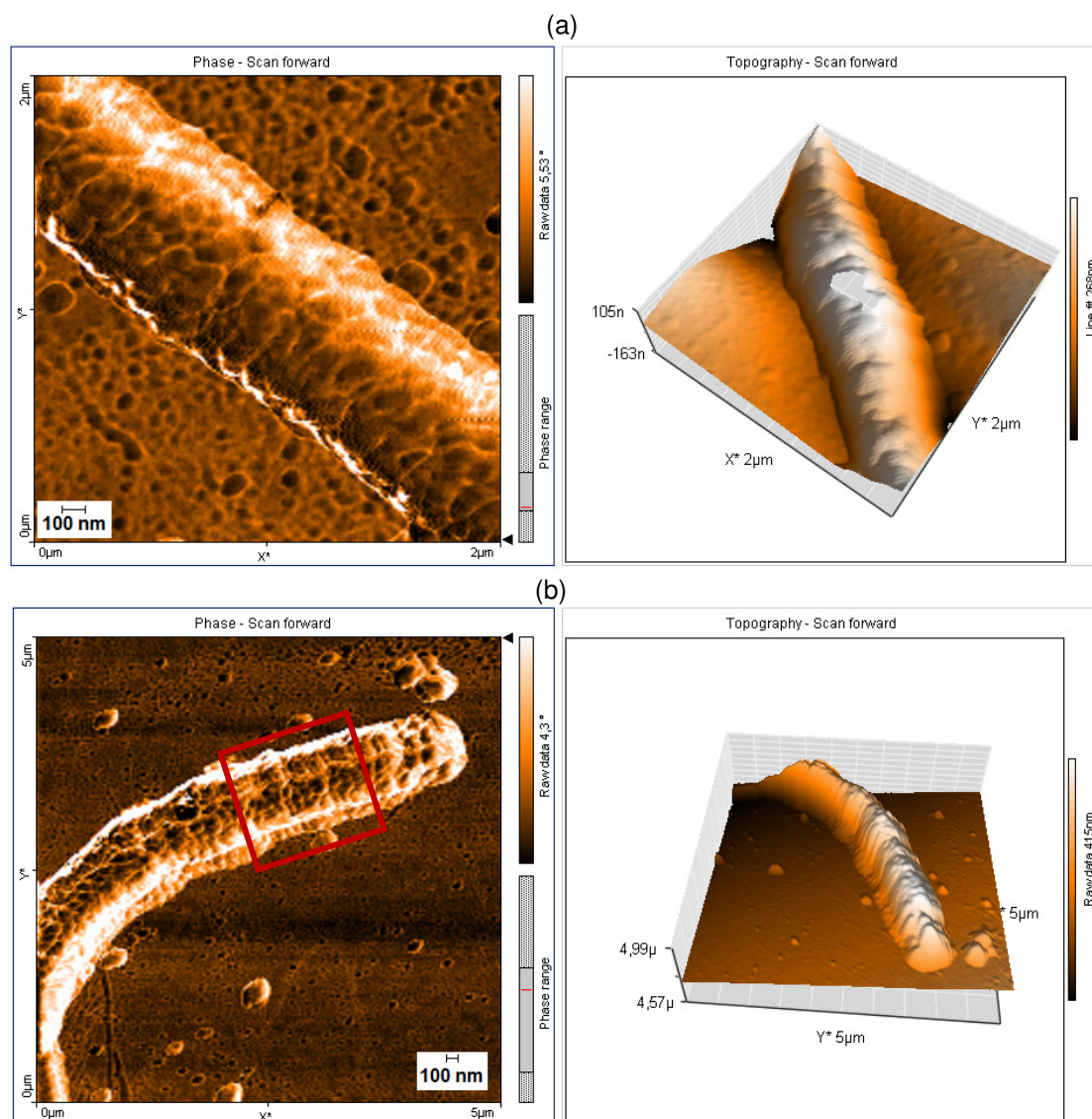


Figura 3.6 – Imagens de AFM (esquerda: imagem obtida em *fase*; direita: reconstrução topográfica) de dois microrganismos presentes nas lamelas em suspensão do ensaio contendo 30 ppm *nPBMA*<sup>1</sup> **(a)** microrganismo 1 – varrimento a 2  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$  e **(b)** microrganismo 2 – varrimento a 5  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$ .



No entanto, após ampliação da zona indicada através do retângulo vermelho na figura 3.6(b) (figura 3.7), verificou-se que as irregularidades observadas na realidade não eram esféricas, pelo que não poderiam corresponder às *nPBMA* em estudo.

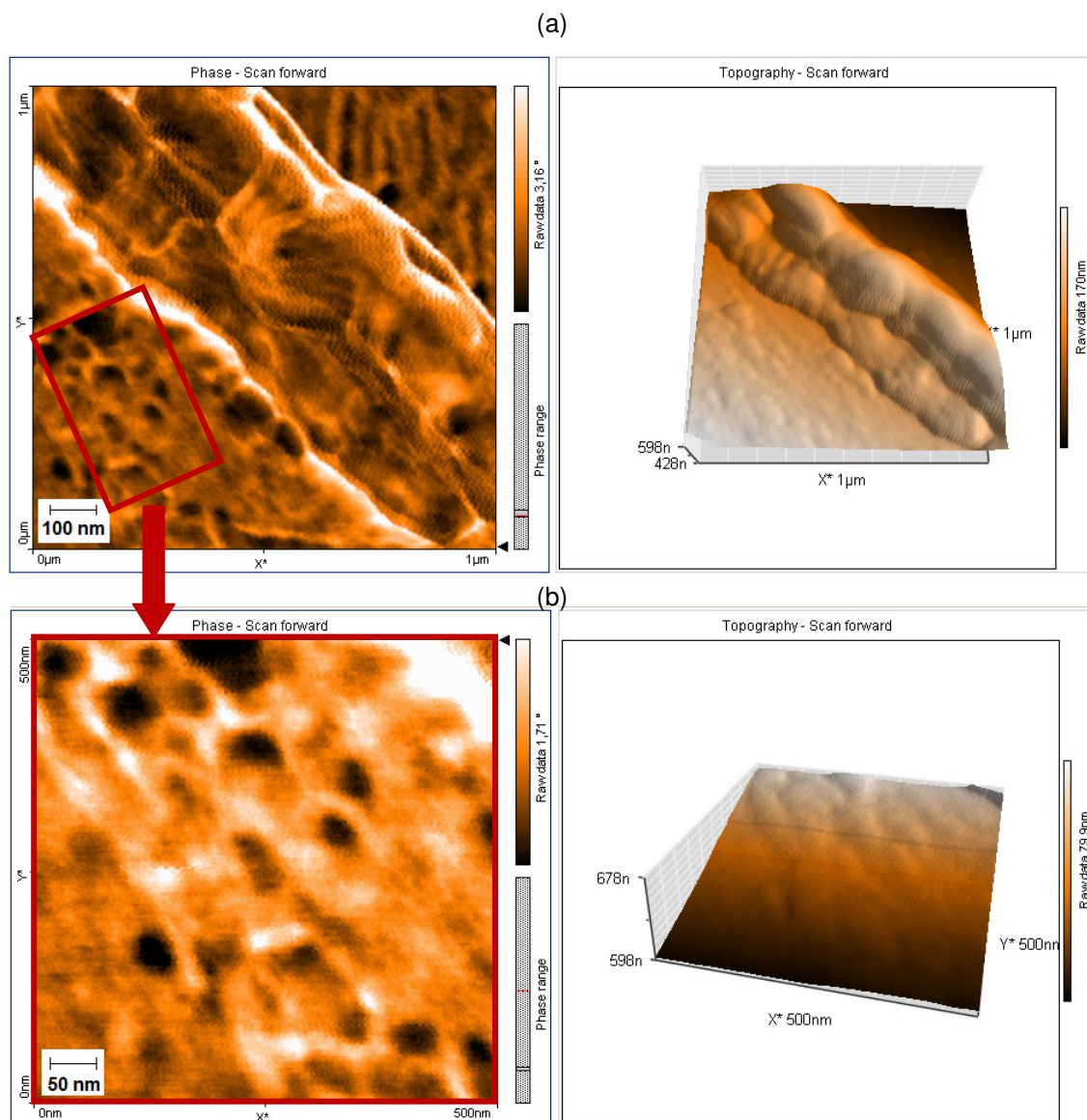


Figura 3.7 – Ampliações sucessivas do retângulo vermelho do microrganismo (b) da figura 3.6 do reator contendo 30 mg/L de *nPBMA*<sup>1</sup> a 1 µm x 1 µm (a) e 500 nm x 500 nm (b). Imagens da esquerda obtidas em *fase*; imagens da direita: reconstruções topográficas.

De referir que esta amostra foi retirada das lamias do reator, onde os microrganismos se encontravam ainda em suspensão.

Conclui-se, com esta análise, que a superfície de cada um dos microrganismos existentes na amostra 2 apresenta uma rugosidade distinta e, possivelmente característica da sua espécie. Através das imagens obtidas por AFM não foi possível identificar nenhum

microrganismo cuja superfície indiciasse a sorção das *nP*. Contudo, convém notar que a população microbiana nas lamas ativadas corresponde a uma cultura mista, pelo que não se exclui a hipótese de algumas espécies não terem sido observadas.

Relativamente aos microrganismos que aderiram à parede do reator do ensaio contendo 30 mg/L de *nPBMA* (amostra 3), foram detetadas irregularidades na superfície dos microrganismos analisados (figura 3.8a).

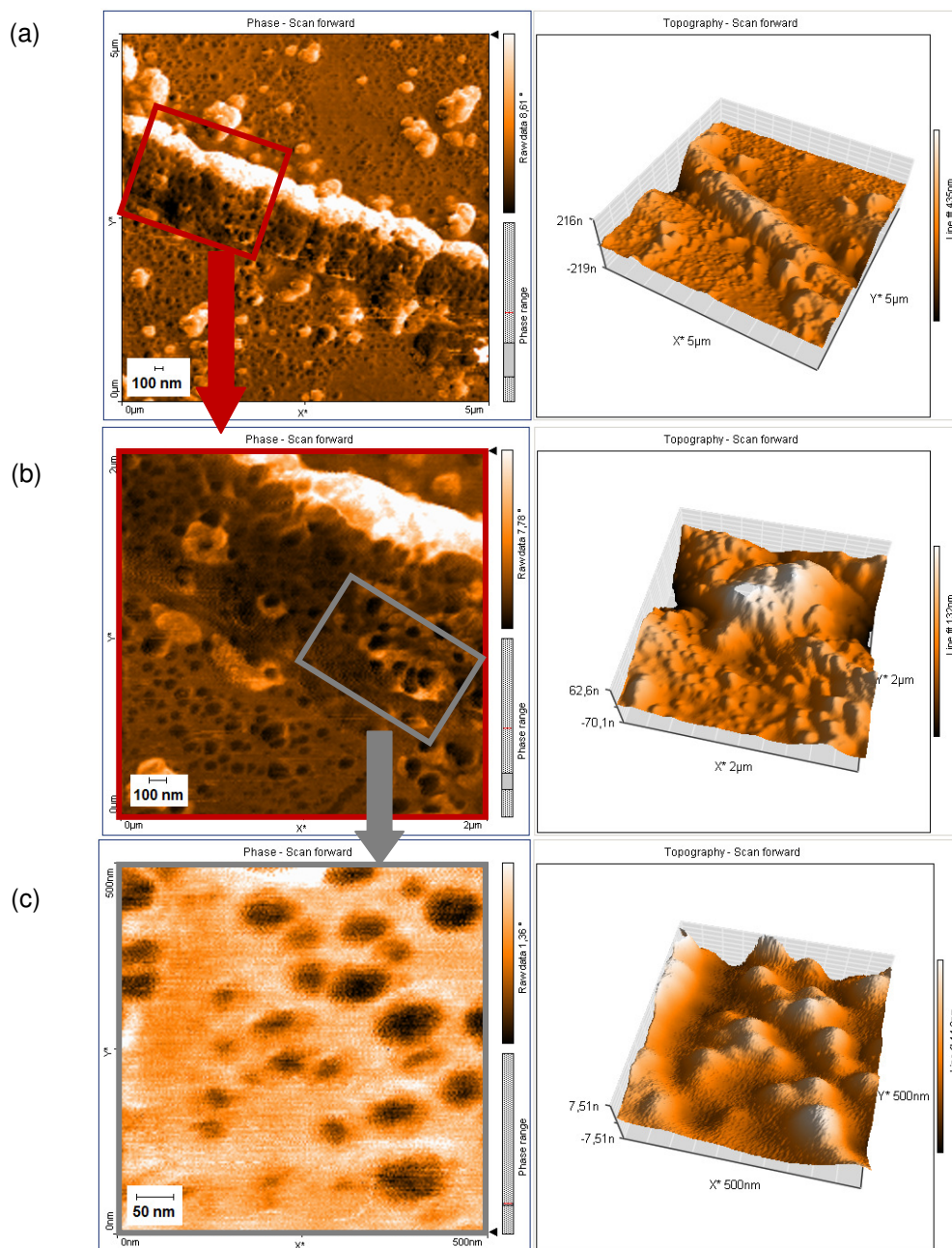


Figura 3.8 – Imagens de AFM (esquerda imagem obtida em *fase*; direita: reconstrução topográfica) de um microrganismo da biomassa alojada na parede do reator contendo 30 mg/L *nPBMA*<sup>1</sup>, **(a)** varrimento a 5 μm x 5 μm; **(b)** ampliação da zona marcada com retângulo vermelho no varrimento (a) a uma escala de 2 μm x 2 μm; **(c)** ampliação da zona marcada com retângulo vermelho no varrimento (b) a uma escala de 500 nm x 500 nm.

Após uma primeira ampliação (figura 3.8b) verificou-se que essas irregularidades tinham forma esférica. Após nova ampliação (figura 3.8c) comprovou-se a morfologia esférica das irregularidades sobre a superfície microbiana e mediu-se o respetivo diâmetro, que correspondia, dentro do erro experimental, aos 50 nm das *nPBMA* em estudo.

Conclui-se existirem *nP* sorvidas à superfície destes microrganismos, o que pode ter sido a causa da sua morte e posterior deposição na parede do reator. Em suma, dentro da cultura mista utilizada, alguns microrganismos não são, aparentemente, afetados pela presença de *nPBMA*, enquanto outros parecem sorver as nanopartículas à sua superfície (provavelmente por atração eletrostática), causando *stress* oxidativo (de acordo com os resultados obtidos pelos testes respirométricos) e, depois, lise. Este efeito contribuirá para a remoção das *nP* das águas residuais, que passarão a ficar concentradas nas lamas. Há, no entanto, interesse em averiguar se, o facto de existir sorção das *nP* aos microrganismos, terá alguma influência, positiva ou negativa, no processo de nitrificação e no consumo de carbono por parte dos microrganismos.

### 3.3. Reatores descontínuos sequenciais

Para verificar os efeitos da presença de *nPBMA* no processo de nitrificação e de remoção de matéria orgânica levados a cabo pelos microrganismos presentes num tanque de lamas ativadas de uma ETAR procedeu-se à implementação de dois reatores descontínuos sequenciais, em simultâneo, nas condições já referidas no ponto 2.7. As condições experimentais foram idênticas nos dois reatores, com exceção da alimentação. Um dos reatores foi alimentado com meio sintético contendo 30 mg/L de *nPBMA*, enquanto o outro foi alimentado com o mesmo meio sintético, mas isento de *nP*. Os reatores estiveram em funcionamento em simultâneo durante 9 dias de modo a que as populações microbianas se adaptassem às novas condições. Após este período, monitorizou-se um ciclo de 8 horas durante as quais se recolheram amostras de hora a hora, em ambos os reatores. Em cada uma destas amostras foram medidos pH, OD e T, tendo-se posteriormente determinado as concentrações de ião amónio, nitrito, nitrato e CQO. Para conservação, as amostras foram filtradas com papel de filtro, acidificadas a pH = 2 com ácido sulfúrico 1 mol/dm<sup>3</sup> e mantidas a 4°C. Os reatores encontravam-se numa sala cuja temperatura ambiente média era 27°C. Os resultados obtidos encontram-se descritos em seguida.

#### 3.3.1. *pH, temperatura e concentração de oxigénio dissolvido*

A monitorização destes parâmetros permitiu verificar a possibilidade de existir influência destes fatores no processo biológico. De acordo com Tchobanoglous, as bactérias nitrificantes são muito sensíveis a fatores ambientais e operacionais, que podem influenciar diretamente o



seu metabolismo interferindo com o mesmo, como é o caso do pH, da T e do OD [Tchobanoglous, 2003]. Na tabela 3.5 comparam-se os valores considerados ótimos para as bactérias nitrificantes (já apresentados na tabela 1.2) com os valores médios medidos durante um ciclo de 8 horas nos reatores implementados.

Tabela 3.5 – Condições de ocorrência de nitrificação e valores médios monitorizados nos SBR implementados.

	pH	T (°C)	OD (mg/L)
<b>Intervalo ótimo*</b>	7,00 – 8,50	25 – 35	3,00 – 4,00
<b>Intervalo de inibição*</b>	< 6,80	T < 5 ; T > 45	< 2,00
<b>Reator sem nPBMA</b>	8,5 ± 0,3	27,1 ± 0,1	4,2 ± 2,5
<b>Reator com 30 mg/L nPBMA</b>	7,6 ± 0,3	26,9 ± 0,2	4,0 ± 2,8

\* [Tchobanoglous, 2003]

Uma vez que as bactérias nitrificantes são mais sensíveis, como as condições ótimas estão asseguradas, pode afirmar-se que também ocorrerá remoção de carbono.

É de referir que, para além do pH, da T e OD, as bactérias nitrificantes são também sensíveis a vários compostos orgânicos e inorgânicos. No âmbito deste projeto apenas se testou a presença de nPBMA. Uma vez que as lamas, depois de recolhidas na ETAR, foram lavadas e posteriormente ressuspensas em água, a única diferença entre o ensaio isento de nP e o ensaio contendo 30 mg/L de nPBMA é apenas a presença destas últimas pelo que a eventual diferença de resultados se deverá a este facto.

Analisando os valores constantes da tabela 3.5 verifica-se que todos os parâmetros medidos nos reatores se encontram dentro dos intervalos ótimos para que ocorra a nitrificação. Assegura-se, assim, que qualquer influência verificada no processo de nitrificação se ficará a dever exclusivamente à presença de nPBMA.

### 3.3.2. Carência química de oxigénio

Também o consumo de carbono por parte da população microbiana foi monitorizado em ambos os reatores durante o ciclo de 8 horas, seguindo o método descrito no ponto 2.4.1. A razão entre o carbono orgânico oxidável disponível ao longo do ciclo relativamente ao existente no início do ciclo está representado na figura 3.9.

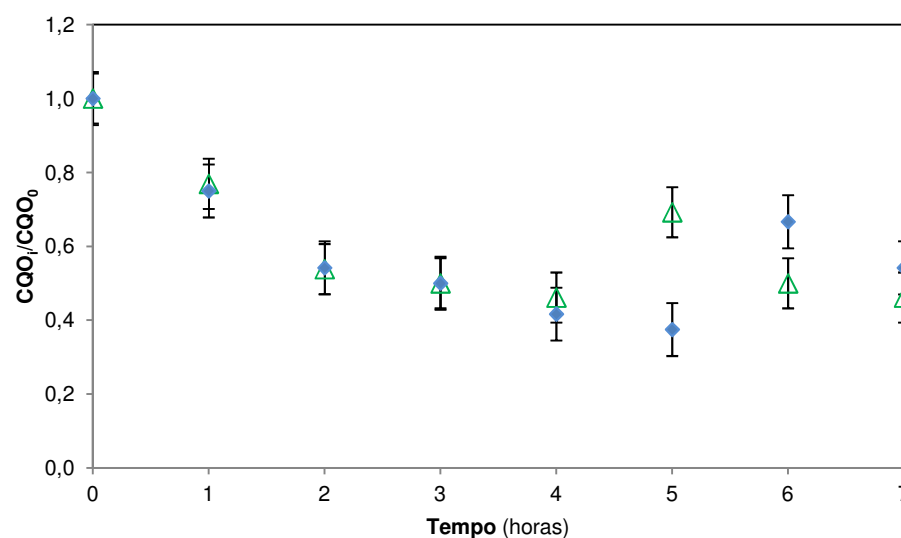


Figura 3.9 – Carbono orgânico oxidável medido em ambos os SBR ao longo do tempo (normalizados face ao carbono orgânico oxidável medido no início do ciclo para o respetivo SBR).

△ Ensaio em branco; ◆ Ensaio com 30 mg/L *n*PBMA

Verifica-se, nesta figura, que a variação do CQO ao longo do ciclo é muito semelhante nos dois reatores, branco e contendo 30 mg/L *n*PBMA, dentro do erro experimental. Os valores de CQO obtidos ao fim de 5 h foram desprezados uma vez que resultam de erro experimental.

Através da representação do consumo global de CQO (figura 3.10), calculado com base nos valores de CQO determinados no início ( $t=0h$ ) e no final ( $t=7h$ ) do ciclo, confirma-se não existir uma variação significativa no consumo de CQO do reator contendo *n*P, comparativamente com o reator isento de *n*P. Aparentemente a presença de *n*PBMA não influencia o processo de remoção de carbono nem afeta as bactérias carbonáceas.

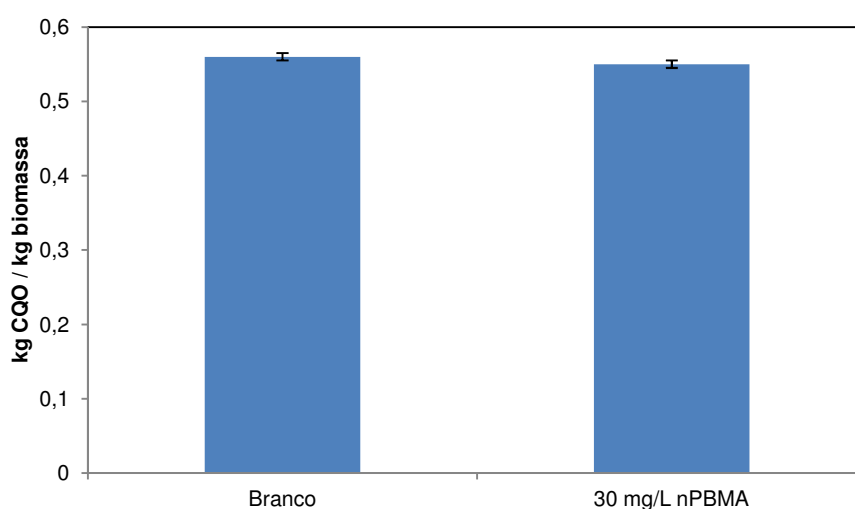


Figura 3.10 – Consumo global de carbono orgânico nos SBR.

### 3.3.3. Processo de nitrificação

De acordo com os métodos analíticos descritos no ponto 2.4 determinaram-se as concentrações dos iões amónio, nitrito e nitrato das amostras recolhidas, de hora a hora, durante um ciclo de 8 horas e também a concentração do ião amónio presente na alimentação dos dois reatores.

No caso específico do **reator alimentado sem *n*PBMA (branco)**, nas primeiras duas horas após o início do ciclo verificaram-se valores de oxigénio dissolvido inferiores a 2,00 mg/L. Este período abrange a fase de alimentação do reator (durante o qual não existe agitação nem arejamento - 15 minutos) e o início do arejamento e da agitação. Na figura 3.11 apresenta-se a evolução das concentrações dos iões  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  a partir da 2ª hora do ciclo, quando os valores de OD já se encontravam no intervalo ótimo para as bactérias nitrificantes.

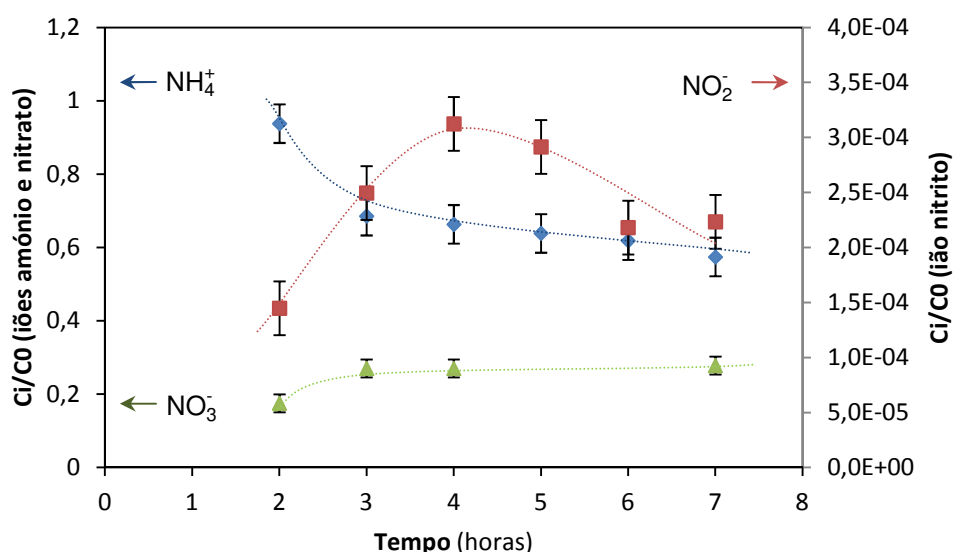


Figura 3.11 – Variação das concentrações de iões amónio, nitrito e nitrato no reator isento de *n*PBMA (branco).

(◆ ião amónio; ■ ião nitrito; ▲ ião nitrato. As linhas a tracejado são apenas para assinalar a tendência)

Analisando a figura, verifica-se uma diminuição na concentração de ião amónio ao longo do tempo, pelo que se pode afirmar que as bactérias nitrificantes estão a desempenhar a sua função; também a concentração de ião nitrato ao longo do ciclo revela uma ligeira tendência crescente confirmando que o ião amónio está a ser oxidado e transformado em ião nitrato. O ião nitrito, sendo uma espécie intermédia no processo de nitrificação, existe em pequena

quantidade, na ordem dos microgramas por litro; como seria de esperar há um aumento na sua concentração e um posterior decréscimo. Este comportamento denota o funcionamento das bactérias *Nitrosomonas sp.*, responsáveis pela primeira etapa do processo de nitrificação, a transformação do ião amónio em ião nitrito, que têm um metabolismo rápido. As bactérias *Nitrobacter sp.* dão início à transformação do ião nitrito em ião nitrato, situação corroborada pelo aumento, ainda que ligeiro, da concentração de ião nitrato e pela diminuição da concentração de ião nitrito. Pode então afirmar-se que ocorre nitrificação no reator correspondente ao ensaio em branco. Os resultados obtidos neste ensaio servirão de base para verificar o efeito da presença de *nPBMA* no processo de oxidação do ião amónio a ião nitrato.

Na figura 3.12 estão representados os resultados obtidos no **reator cuja alimentação continha 30 mg/L de *nPBMA***. Neste reator a concentração de oxigénio dissolvido foi inferior a 2 mg/L nas primeiras 3 horas do ciclo, pelo que se decidiu não monitorizar a nitrificação neste período, apresentando-se apenas os resultados após as 3 horas. Tal como na situação anterior, também aqui se verifica um decréscimo na concentração de ião amónio que, contudo, não é tão acentuada. Em contrapartida, a formação de ião nitrato revela-se algo inconstante e o pico de concentração do ião nitrito ocorre ao fim de 5 horas do início do ciclo, o que poderá significar que o metabolismo das *Nitrobacter sp.* é afetado pela presença de *nPBMA*. A concentração de ião nitrito varia de modo idêntico ao verificado no reator isento de *nP*: cresce e, em seguida, decresce. Os valores relativos aos iões nitrito e nitrato obtidos neste reator são claramente inferiores (cerca de uma ordem de grandeza) aos obtidos no reator isento de *nPBMA*, revelando uma atividade menor de ambas as bactérias nitrificantes.

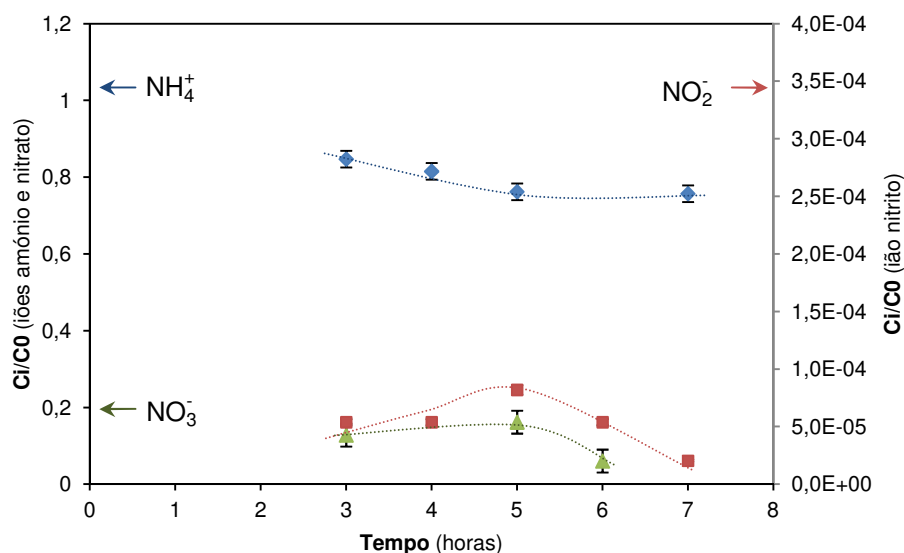


Figura 3.12 – Variação das concentrações de iões amónio, nitrito e nitrato no reator contendo 30 mg/L de *nPBMA*.

(♦ ião amónio; ■ ião nitrito; ▲ ião nitrato. As linhas a tracejado são apenas para assinalar a tendência)

Já verificada a tendência das concentrações dos iões envolvidos no processo de nitrificação é também importante verificar a capacidade de remoção do ião amónio por parte das bactérias nitrificantes, deste modo calculou-se a variação das percentagens de remoção ao longo do ciclo de 8 horas tendo como base as concentrações de N no início do ciclo ( $t=0h$ ) e as concentrações de N ao longo do tempo, excetuando nas horas em que a concentração de oxigénio dissolvido era inferior a 2 mg/L. Os resultados encontram-se representados na figura 3.13.

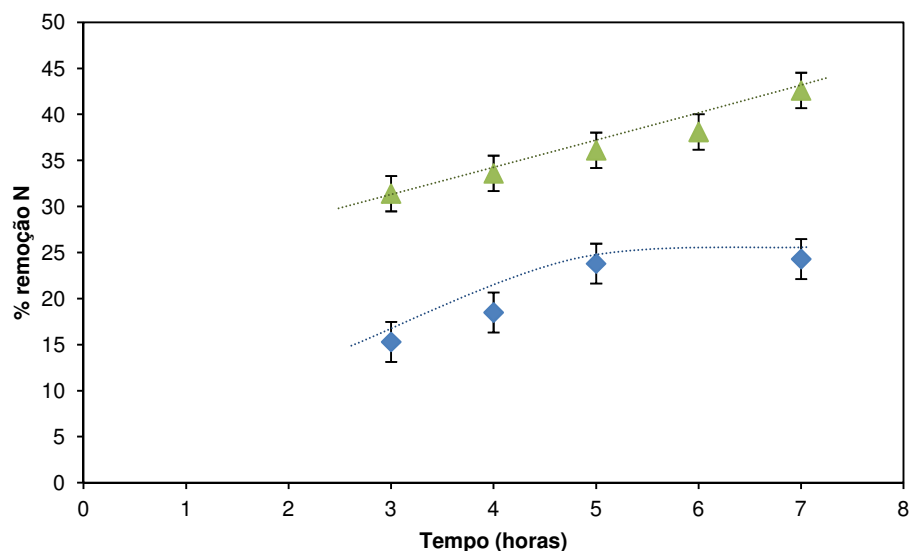


Figura 3.13 – Percentagem de remoção de N obtida no processo de nitrificação em ambos os reatores.

( ▲ Ensaio em branco; ◆ Ensaio com *nPBMA* 30 mg/L. As linhas a tracejado são apenas para assinalar a tendência)

A percentagem média de remoção do ensaio em branco foi de 36% e a do ensaio com *nPBMA* foi de 20%. Verifica-se assim que a presença de 30 mg/L de *nPBMA* influencia o processo de nitrificação, diminuindo a sua eficiência, neste caso específico, para cerca de metade. As *Nitrobacter sp.* parecem ser a espécie mais afetada pelas *nP* uma vez que a concentração de ião nitrato, que deveria aumentar ao longo do ciclo, não aumenta. A razão para as *Nitrosomonas sp* não serem tão negativamente afetadas com a presença de *nPBMA* pode estar relacionada com o facto de o seu metabolismo ser mais rápido comparativamente com o das *Nitrobacter sp.* Na figura 3.14 representou-se o consumo de azoto, na forma de ião amónio, por parte dos microrganismos. Estes valores foram obtidos através das concentrações de ião amónio no início e no final do ciclo ( $t(h, OD > 2 \text{ mg/L})$ ). Verifica-se que as *Nitrosomonas sp* diminuem o consumo de ião amónio na presença de *nPBMA*, resultado que está em concordância com a diminuição da eficiência no processo de remoção de azoto.

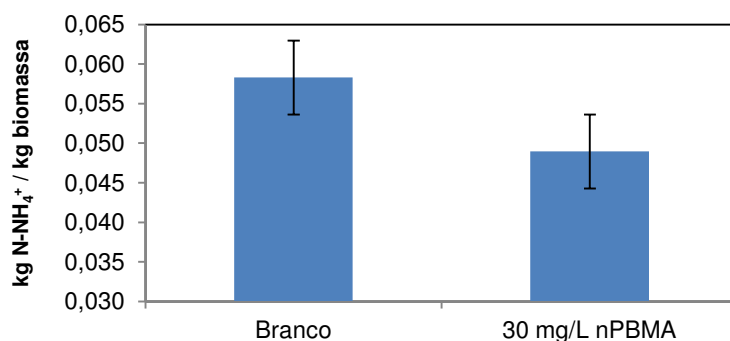


Figura 3.14 – Consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por unidade de massa de microrganismos durante o processo de nitrificação em ambos os reatores

O valor experimental do pH, mais baixo no reator alimentado com *nP* (ver tabela 3.5), vai ao encontro das conclusões tiradas nas cinéticas dos compostos azotados, uma vez que o ião amónio é um ácido fraco e os iões nitrito e nitrato são ambos bases fracas. Se na presença de *nPBMA* a oxidação do ião amónio é menor, haverá menor formação dos restantes iões, o que significa que existe menos consumo da espécie ácida e, consequentemente menos formação das espécies alcalinas pelo que o pH será, forçosamente, mais baixo.

Por outro lado, também a biomassa integrante nos SBR poderá justificar esta diferença no valor de pH. De acordo com os testes respirométricos, na presença de *nPBMA* a taxa de respiração específica aumenta, o que significa que os microrganismos estão a consumir mais oxigénio e a produzir mais dióxido de carbono que, na presença de água, origina ácido carbónico e que também contribui para baixar o valor de pH no reator.

### 3.3.4. Sólidos suspensos

Os SST foram determinados 1 hora após o início do ciclo e no final do mesmo (uma vez que no início do ciclo,  $t = 0$  h, os reatores estavam na fase de alimentação, sem arejamento nem agitação, pelo que a população microbiana estava sedimentada).

Devido a problemas experimentais, não foi possível determinar os SSV, no entanto, com base nos resultados obtidos para os SST, torna-se possível estimar valores de SSV. De acordo com Sperling, para um sistema de lamas ativadas convencional, que é o caso, a concentração de SSV corresponde a cerca de 70% da concentração de SST [Sperling, 2007]. No reator isento de *nP* obteve-se exatamente o mesmo valor de SST no início e no final do ciclo (500 mg/L) levando a assumir que também não terá existido uma alteração significativa nos valores de SSV. Já no reator contendo 30 mg/L de *nPBMA* verificou-se um aumento de 100 mg/L na concentração de SST desde o início até ao fim do ciclo (que passou de 400 para 500 mg/L), assumindo-se que também a concentração de SSV teria refletido este aumento. De acordo com estes resultados a presença de *nPBMA* parecia, portanto, favorecer o crescimento de

biomassa no reator, o que contraria com o facto do consumo de compostos azotados ser menor neste mesmo reator (ver 3.3.2 e 3.3.3).

De referir, contudo, que devido à pequena capacidade do reator e ao facto de ter sido igualmente necessário recolher 8 amostras de 50 mL para os estudos cinéticos, se recolheu apenas uma amostra de cada vez para a determinação dos sólidos suspensos, no lugar das 3 amostras recomendadas para meios heterogéneos (como são estas lamas). O intervalo de erro associado aos valores de SST é, portanto, muito grande e o associado aos valores de SSV, estimados a partir dos SST, ainda será maior. Assim sendo, decidiu-se não considerar estes valores na continuação do estudo.

### 3.4. Reatores contínuos

Depois de testados os efeitos da presença de *n*PBMA na remoção de matéria orgânica e no processo de nitrificação de um sistema de lamas ativadas em regime descontínuo sequencial seguiu-se a verificação desses efeitos em regime contínuo. Deste modo implementou-se um reator nas condições já referidas no ponto 2.8. Este reator funcionou inicialmente durante 32 dias sem a adição de *n*PBMA na alimentação, para que a população microbiana se pudesse adaptar às novas condições. Contudo, por razões logísticas, não foi possível confirmar, na altura, a estabilização das lamas do reator (as amostras recolhidas nesses 32 dias só puderam ser analisadas à posteriori). Decorrido esse período o reator passou a ser alimentado com meio sintético contendo 30 mg/L das *n*P em estudo (durante mais 31 dias). Foram recolhidas amostras da alimentação e da saída do decantador às 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> feiras que, posteriormente foram filtradas com papel de filtro, acidificadas a pH = 2 (com ácido sulfúrico 1 mol/dm<sup>3</sup>) e mantidas a 4°C, até serem analisadas (CQO, concentrações de ião amónio, ião nitrito e ião nitrato). Nos dias das recolhas foram também medidos pH, temperatura e OD na alimentação, tanto no reator como na saída do decantador. Os resultados obtidos encontram-se descritos nos pontos seguintes.

#### 3.4.1. *pH, temperatura e concentração de oxigénio dissolvido*

Tal como nos SBR, também neste caso específico foi necessário verificar se estavam reunidas as condições, relativamente a estes parâmetros, para que os processos biológicos (remoção de carbono e nitrificação) ocorressem.

Na tabela 3.6 apresentam-se os valores experimentalmente obtidos de pH, T e OD e comparam-se com os parâmetros referidos como ótimos para a nitrificação na bibliografia (mencionados na tabela 1.2, mas que aqui se voltam a repetir para uma mais fácil comparação com os valores experimentais).

Tabela 3.6 – Condições para a ocorrência de nitrificação e valores médios monitorizados nos reatores implementados.

		Alimentação	Reator	Decantador
pH	Intervalo ótimo*	-	7,0 – 8,5	-
	Reator sem <i>n</i> PBMA	6,9 ± 0,2	8,8 ± 0,2	8,7 ± 0,1
	Reator contendo 30 mg/L <i>n</i> PBMA	7,1 ± 0,2	7,1 ± 0,3	7,6 ± 0,5
Temp. (°C)	Intervalo ótimo*	-	25 – 35	-
	Reator sem <i>n</i> PBMA	26,4 ± 0,8	25,6 ± 0,7	26,4 ± 0,8
	Reator contendo 30 mg/L <i>n</i> PBMA	26,8 ± 0,7	25,8 ± 0,5	26,2 ± 0,7
OD (mg/L)	Intervalo ótimo*	-	3,00 – 4,00	-
	Reator sem <i>n</i> PBMA	2,8 ± 1,8	5,5 ± 1,1	2,1 ± 1,1
	Reator contendo 30 mg/L <i>n</i> PBMA	3,1 ± 1,1	6,1 ± 1,5	3,7 ± 1,2

\* [Tchobanoglous, 2003]

Os resultados experimentais a comparar com os valores de referência são os medidos no reator uma vez que é aqui que decorre o processo de tratamento. A monitorização destes parâmetros na alimentação e na saída do decantador serviu apenas como uma indicação das condições que antecederam e precederam, respetivamente, as condições no reator. No entanto, os valores de OD nestes dois órgãos do sistema são perfeitamente expectáveis uma vez que não estavam a ser arejados.

Verifica-se então que, no reator, os valores se encontram dentro dos intervalos considerados ótimos pela literatura [Tchobanoglous, 2003] para a ocorrência do processo de nitrificação. Denote-se apenas que a concentração de oxigénio dissolvido, tanto no reator isento de *n*P como no reator contendo *n*PBMA, é superior a 5,00 mg/L. Contudo, como o processo de nitrificação apenas é inibido para concentrações inferiores a 2,00 mg/L, não se espera que o elevado valor de OD influencie negativamente o desempenho das bactérias nitrificantes. Como já referido no ponto 3.3.1 uma vez que as bactérias nitrificantes são mais sensíveis e como as condições ótimas estão asseguradas, pode igualmente considerar-se reunidas as condições para uma eficiente remoção de carbono.



### 3.4.2. Sólidos suspensos totais

Foram determinados os SST no reator contínuo, ao longo do seu período de funcionamento. Não houve purga de lamas, mas ocorreram problemas de sedimentação pelo que os SST foram analisados também na saída do decantador, para além do tanque de arejamento. Os resultados obtidos estão representados na figura 3.15.

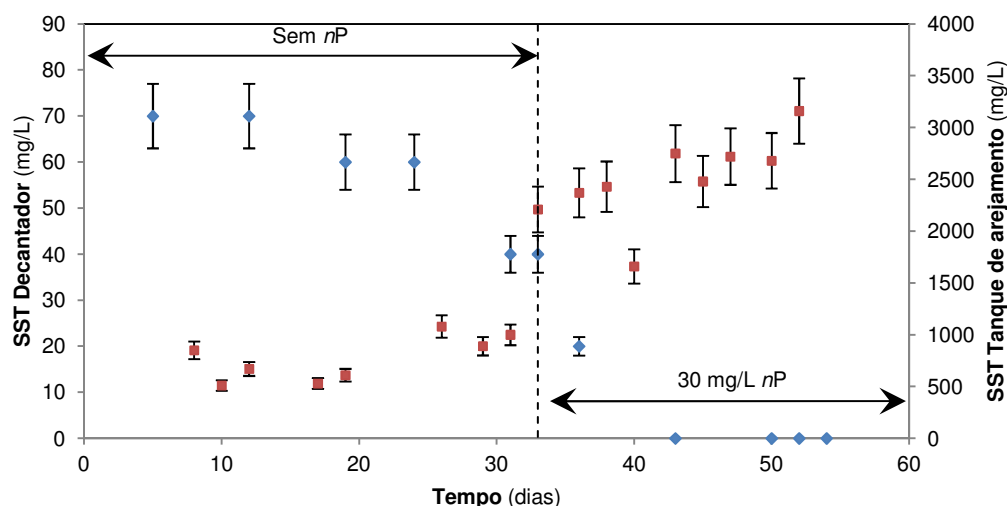


Figura 3.15 – Variação da concentração de SST no tanque de arejamento e na saída do decantador do reator contínuo.

(■ SST no tanque de arejamento; ◆ SST no decantador)

O problema de sedimentação já referido verifica-se pela presença de SST na saída do decantador. De acordo com Espírito-Santo, a capacidade de sedimentação das lamas aumenta com o aumento da sua idade [Espírito-Santo, 2004]. No período inicial de funcionamento do reator, em que a idade das lamas era reduzida, a sua sedimentabilidade também o era, pelo que uma parte significativa de lamas acabou por abandonar o reator através do decantador. Contudo, à medida que a idade de lamas foi aumentando, as características de sedimentação também sofreram alterações, verificando-se uma diminuição da concentração de SST na saída do decantador e o respetivo aumento no tanque de arejamento. De referir que, nestas condições, a idade média das lamas dentro do reator passou a aumentar mais rapidamente.

Dos resultados experimentais obtidos na figura 3.15, para além do efeito da idade das lamas, não sobressai mais nenhum detalhe que possa ser relacionado com a adição de *nPBMA*.

### 3.4.3. Carência química de oxigênio

Também se monitorizou o consumo de matéria orgânica oxidável por parte da população microbiana em regime contínuo, seguindo mais uma vez o método descrito no ponto 2.4.1. Pela figura 3.16 verifica-se um decréscimo acentuado no consumo de matéria orgânica por parte da população microbiana ao fim de cerca de 35 dias de experiência.

De referir novamente que, embora não tenha sido efetuada purga à biomassa na instalação em questão, verificou-se uma saída ainda considerável de microrganismos pelo decantador durante o período inicial de funcionamento do reator, razão pela qual a idade média das lamas terá aumentado lentamente durante este período de tempo. No entanto, ao fim de algum tempo ( $t \cong 30$  dias), a idade das lamas começou a aumentar de uma forma mais significativa, tal como foi já discutido em 3.4.2. De acordo com Espírito-Santo, em Portugal, as lamas costumam ser de arejamento prolongado pelo que se utilizam lamas com 20 ou mais dias [Espírito-Santo, 2004] podendo chegar aos 40 dias [Tchobanoglous, 2003]. Dado que a eficiência de remoção da matéria orgânica diminui com o aumento da idade das lamas [Tchobanoglous, 2003], a evolução da remoção de CQO dentro do tanque de arejamento representados na figura 3.16 pode ser exclusivamente explicada por este efeito: mantém-se aproximadamente constante no período de envelhecimento lento das lamas, decrescendo de uma forma significativa na altura em que o envelhecimento das lamas também se acentua. Mais uma vez, da leitura da figura 3.16, não se consegue identificar nenhuma alteração adicional que se possa atribuir à introdução das *n*PBMA o que, de resto, também não seria de esperar já que se verificou (nos ensaios efetuados nos SBR) que este xenobiótico praticamente não influenciava a eficiência das bactérias carbonáceas (ver ponto 3.3.2).

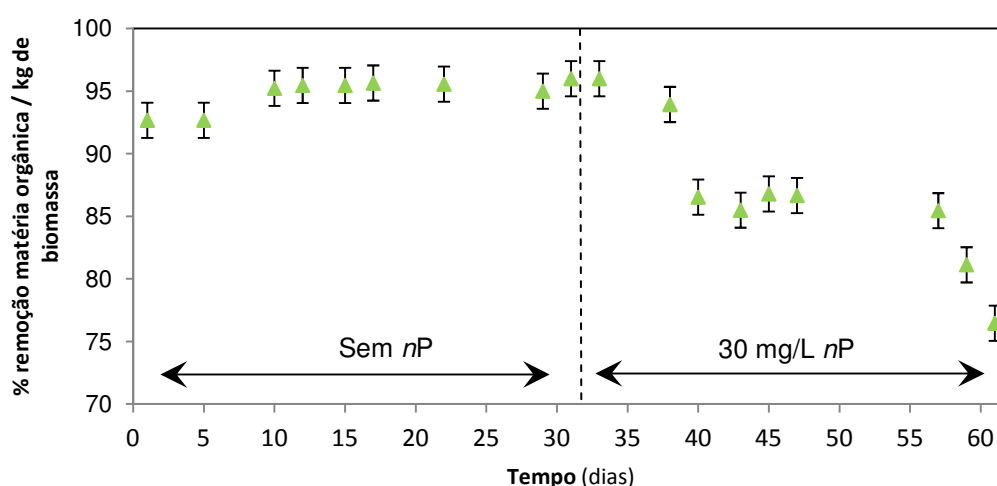


Figura 3.16 – Percentagem de remoção de carbono orgânico nos reatores contínuos.

### 3.4.4. Processo de nitrificação

Nas amostras recolhidas na alimentação e na saída do decantador determinaram-se, seguindo os procedimentos descritos no ponto 2.4, as concentrações dos iões amónio, nitrito e nitrato. Na figura 3.17 representa-se a percentagem de remoção do ião amónio. Estes valores foram calculados com base nas concentrações de ião amónio do afluente (alimentação do reator) e do efluente (na saída do decantador), uma vez que se trata de um sistema a operar em regime contínuo.

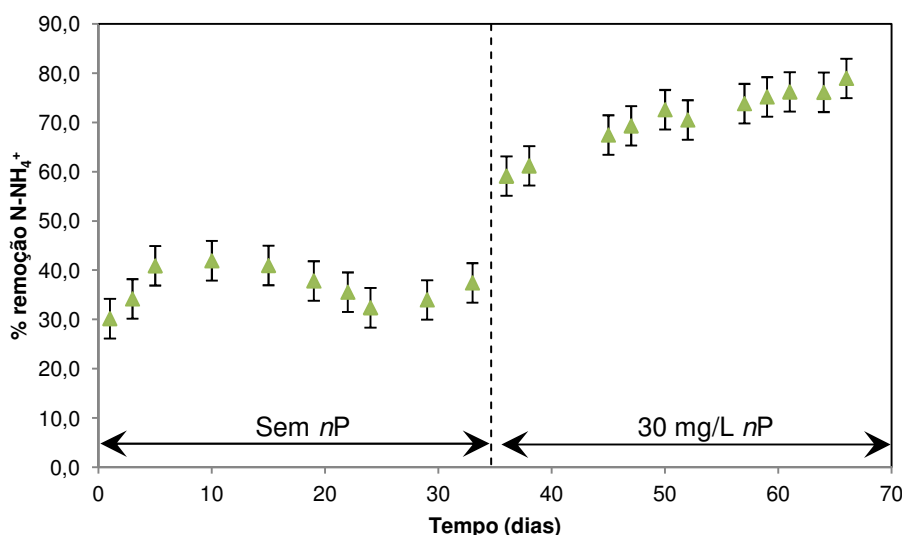


Figura 3.17 – Percentagem de remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nos reatores contínuos, sem *nP* e na presença de 30 mg/L *nPBMA*.

As bactérias nitrificantes têm um crescimento lento pelo que, normalmente necessitam de 7 a 10 dias para iniciar um processo de nitrificação eficiente. A figura 3.17 mostra esse período de adaptação durante os primeiros dias, quando a % de remoção de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> aumenta. Após esse período, verifica-se uma fase de estabilização, que corresponde à fase em que a % remoção é praticamente constante, dentro do erro experimental. A esta fase de estabilização segue-se uma fase de crescimento, com início por volta dos 30 dias, mais uma vez a altura em que se dá o início do envelhecimento mais acentuado das lamas. De acordo com Eckenfelder, à medida que as lamas envelhecem as bactérias nitrificantes tornam-se mais eficientes, justificando o incremento na nitrificação [Eckenfelder, 1989]. O facto do período de incremento acentuado na remoção de azoto se iniciar antes do período de decréscimo acentuado na remoção de carbono orgânico poderá estar relacionado com o facto das bactérias nitrificantes serem mais sensíveis do que as carbonáceas. Refere-se que, tal como aconteceu no estudo da variação dos sólidos e da remoção de CQO ao longo do tempo, também aqui não é evidente nenhuma alteração que possa ser diretamente atribuída à introdução das *nPBMA*. Embora nos estudos com os SBR se tenha concluído haver um decréscimo da eficiência do processo de nitrificação pela presença deste xenobiótico, este efeito poderá estar aqui camuflado pelo facto do

momento de introdução das *nPBMA* coincidir com a zona de variação acentuada da remoção de azoto.

Torna-se, por este motivo, importante analisar a variação da concentração dos vários iões envolvidos na nitrificação ao longo do tempo, em busca de eventuais indícios sobre o efeito de introdução das *nPBMA*. Na figura 3.18 representa-se a formação de  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NO}_3^-$  referentes às duas fases de alimentação do reator, isenta de *nP* e contendo 30 mg/L de *nPBMA*.

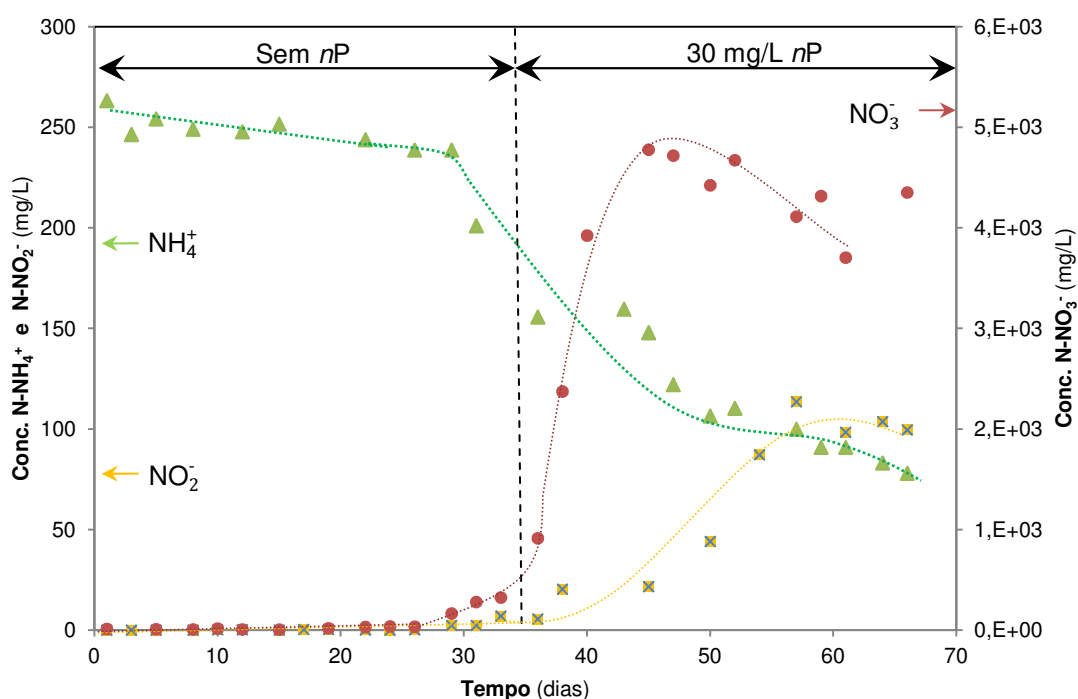


Figura 3.18 – Variação das concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{N-NO}_2^-$  ( $\blacklozenge$ ) e  $\text{N-NO}_3^-$  ( $\bullet$ ) no reator contínuo sem adição de *nPBMA* e, posteriormente contendo 30 mg/L *nPBMA*.

(as linhas a tracejado são apenas para assinalar a tendência; não se apresentam as barras de erro para facilitar a leitura do gráfico, no entanto o erro relativo é inferior a 10%).

Verifica-se a ocorrência da nitrificação, facto já esperado uma vez que pH, T e OD se encontravam dentro do intervalo ótimo para a sua ocorrência. Como tal, a concentração de  $\text{NH}_4^+$  decresce ao longo do tempo, apresentando um decréscimo mais acentuado a partir dos 30 dias, aproximadamente na mesma altura em que a % de remoção de  $\text{NH}_4^+$  aumenta (ver figura 3.17). Esta situação coincide com o período de envelhecimento mais acentuado das lamas, conforme explicado anteriormente. Como as concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  também aumentam nesta altura, confirma-se que o processo de nitrificação está a tornar-se mais eficiente com o passar do tempo.

Não é, mais uma vez, possível detetar a influência da introdução de *n*PBMA no processo de nitrificação pois não se consegue identificar nenhuma alteração no andamento das linhas traçadas ao fim de 32 dias (período em que se introduziram as *n*P na alimentação do reator). Para que os resultados pudessem ser mais conclusivos, as *n*PBMA deveriam ter sido introduzidas mais tarde. De referir, novamente, que devido a restrições de carácter experimental, as amostras só puderam ser analisadas à posteriori.

# **Capítulo 4 : Conclusões e trabalho futuro**

Aqui encontram-se descritas as principais conclusões retiradas dos resultados obtidos e apresentam-se propostas para trabalhos futuros.



## 4.1. Conclusões

Este trabalho tinha dois objetivos distintos:

- Identificar o destino das *nP* poliméricas presentes nas águas residuais numa ETAR: se seriam degradadas pelos microrganismos ou, no caso contrário, identificar a forma com que abandonariam a ETAR, se na linha de efluente tratado, se na linha de lamas;
- Estudar a influência das *nP* na eficiência de remoção de dois nutrientes (C e N) no tratamento biológico por lamas ativadas.

Relativamente ao primeiro objetivo, os estudos por GPC (ponto 3.2.2) revelaram inequivocamente que os microrganismos presentes no tratamento por lamas ativadas não têm capacidade para degradar quimicamente as *nPBMA*, pelo que se terá de excluir a hipótese da sua destruição durante este tratamento. De referir que não foi encontrada bibliografia, em nenhum dos estudos mencionados no ponto 1.5 referência à degradação de *nP* (mesmo com condições químicas distintas) como mecanismo de remoção das mesmas do efluente tratado.

Dos estudos efetuados por DLS (pontos 3.1.2 e 3.1.3) verificou-se que a atividade microbiana favorece a agregação das *nP*, processo que, se for seguido de precipitação, encaminhará para as *nPBMA* para a linha de lamas. O mesmo tipo de estudo em lamas brutas (ponto 3.1.1) também já tinha demonstrado que uma fração significativa das *nPBMA* teria sido degradada ou precipitaria. Dado que a primeira hipótese já foi excluída, considera-se a hipótese precipitação. Também Ganesh concluiu que a agregação, com posterior deposição, é um dos mecanismos de remoção de *nP* de cobre de um efluente [Ganesh, 2010].

Das imagens obtidas por AFM conclui-se que as *nPBMA* se conseguiram sorver a algumas das espécies presentes na população microbiana. Verificou-se, contudo, que nem todas as espécies presentes teriam capacidade para sorver as *nPBMA* e que, as que o faziam, acabavam por morrer. Estes resultados explicam de alguma forma o facto de se terem determinado maiores taxas de respiração específica nos reatores descontínuos ao fim de 3 horas de contacto com os microrganismos: as *nPBMA* deverão sorver-se nos microrganismos levando-os a entrar, numa primeira fase, em *stress* oxidativo, o que, ao fim de maiores tempos de contacto, poderá levar os microrganismos com *nPBMA* sorvidas à morte. O facto da taxa de respiração específica ser independente da concentração de *nPBMA* parece ainda indicar que este parâmetro deve depender apenas do número de locais de ligação disponíveis para a sorção e que, portanto, em todos os reatores a concentração de *nPBMA* estava em excesso face ao número desses locais. As *nP* de prata estudadas por Choi também se ligam às células microbianas causando fragilidade na parede celular e, a sua acumulação nos microrganismos, terá um efeito de deterioração dos mesmos [Choi, 2008].

Conclui-se, portanto, que as *nP*, não sendo destruídas no tratamento de lamas ativadas, acabam por abandonar o tanque na linha de lamas, quer por precipitação, quer adsorvidas a



algumas espécies de microrganismos. Não foram feitas experiências que permitam tirar qualquer conclusão acerca da eventual permanência na linha do efluente tratado.

Quanto ao efeito das *nP* na eficiência do processo de remoção de nutrientes no tratamento por lamas ativadas, os ensaios efetuados nos SBR permitiram concluir que a presença das *nPBMA* praticamente não influencia a taxa de remoção de carbono orgânico, mas diminui a eficiência do processo de nitrificação neste mesmo regime (descontínuo sequencial). Pelo facto das bactérias nitrificantes serem mais sensíveis que as carbonáceas, estes resultados não são de estranhar. Recorda-se, ainda, que a sorção das *nPBMA* se verificava apenas em determinadas espécies de microrganismos, diminuindo a sua viabilidade. Choi estudou o efeito de *nP* de prata verificando uma maior inibição nas bactérias nitrificantes comparativamente com a prata nas formas iónica e coloidal [Choi, 2008]. Infelizmente os resultados obtidos em regime contínuo não foram conclusivos, já que a introdução das *nPBMA* coincidiu com o período de envelhecimento acelerado das lamas. Pode-se apenas concluir ter sido o envelhecimento acelerado das lamas o fator que mais influenciou a performance dos microrganismos, não permitindo tirar conclusões acerca da introdução das *nP*.

Por último resta referir que, embora estes materiais sejam biocompatíveis à escala macroscópica (usados em lentes de contacto, implantes dentários, etc.) deixam de o ser à escala nano.

## 4.2. Trabalho futuro

Caso não tivesse existido uma limitação de tempo para o trabalho experimental (por estar incluído num programa de Mestrado) teriam, sem dúvida, sido repetidos os ensaios efetuados na instalação piloto de lamas ativadas, em condições otimizadas com base na experiência anterior, de forma a eliminar os problemas detetados neste primeiro ensaio e a conseguir resultados conclusivos, que pudessem complementar os retirados dos ensaios efetuados nos reatores descontínuos e nos SBR.

Embora tenha permitido tirar algumas conclusões relativamente aos efeitos da presença das *nPBMA* num sistema de tratamento por lamas ativadas, o trabalho desenvolvido ao longo deste projeto trouxe também novas questões, nomeadamente: *Será que os microrganismos adsorvem ou absorvem as nP? Se as lamas forem posteriormente utilizadas na agricultura, será que prejudicam as culturas? Será que também é possível encontrar nP na linha de efluente tratado? Nesse caso, será que as nPBMA que não fossem removidas na ETAR provocariam ecotoxicidade no meio recetor?* Pelo que seria praticamente impossível não existirem ainda trabalhos a desenvolver.

Para responder à primeira questão e averiguar mais profundamente a ocorrência de sorção, poderia expor-se as lamas ativadas a *nPBMA* marcadas com compostos fluorescentes

para, posteriormente, através de técnicas de microscopia confocal, concluir se ocorreu absorção (interior do microrganismo) ou adsorção (exterior do microrganismo) das *nP* aos microrganismos.

No que diz respeito à questão seguinte, seria interessante recolher as lamas obtidas no estudo com partículas marcadas com cromóforos fluorescentes e utilizá-las no cultivo de uma planta, a fim de se analisar a ocorrência de *uptake* das *nPBMA* das lamas para a planta e, caso a resposta seja positiva, se será prejudicial ao desenvolvimento da planta ou, eventualmente, ao consumidor da mesma. Também seria interessante aprofundar estes estudos na área da microbiologia, procurando identificar as espécies de microrganismos que sorvem as *nP* (através de FISH, por exemplo) e/ou verificar as alterações que ocorrem no metabolismo desses microrganismos.

De modo a confirmar a saída de *nPBMA* da ETAR juntamente com o efluente tratado, poderiam submeter-se amostras recolhidas do decantador integrante do reator contínuo a ensaios por DLS. Refere-se que estes ensaios não foram realizados durante esta tese por razões logísticas, que se prendem com a distância física entre o reator (que se encontrava em Setúbal) e o equipamento de DLS (localizado em Lisboa). Para além do fator tempo, o próprio trepidar das amostras numa eventual viagem entre as duas cidades poderia afetar o sentido dos resultados. Caso este estudo conduzisse a resultados positivos, seria ainda interessante efetuar-se testes de ecotoxicidade das *nPBMA* em organismos aquáticos.



# Referências bibliográficas

- [Agency, 2007]: Agency, U. E. (2007). *Nanotechnology White Paper*. U.S. Environmental Protection Agency.
- [AWWA, 1999]: AWWA. (1999). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 20ª edição.
- [Barreiros, 2003]: L. Barreiros, B. Nogales, C. M. Manaia, A. C. S. Ferreira, D. H. Pieper, M. A. Reis, O. C. Nunes. (2003). A novel pathway for mineralization of the thiocarbamate herbicide molinate by a defined bacterial mixed culture. *Environ. Microbiol.*, 5, pp. 944-953.
- [Brar, 2010]: Brar, S.; Verma, M.; Tyagi, R.D.; Surampalli, R.Y. (2010). Engineered nanoparticles in wastewater and wastewatersludge - evidence and impacts. *Waste Management*, 30, pp. 504-520.
- [Choi, 2008]: Choi, O.; Deng, K.; Kim, N.; Ross Jr., L.; Surampalli, R. & Hu, Z. (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, 42, pp. 3066-3074.
- [Eckenfelder, 1989]: Eckenfelder, W.W. (1989) *Industrial water pollution control*. 2ª edição, McGraw-Hill, Singapura.
- [Espírito-Santo, 2004]: Espírito-Santo, I., Fernandes, E., Araújo, M., Ferreira, E. (2004). Optimização de um processo biológico de tratamento de águas residuais. In Conferência Nacional do Ambiente, Actas da 8.ª Conferência Nacional do Ambiente (p. 316-317). Lisboa, 2004.
- [Fabrega, 2009]: Fabrega, J.; Fawcett, S.; Renshaw, J. & Lead, J. (2009). Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration and organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, 43, pp. 7285-7290.
- [Feynman, 1960]: Feynman, R. (1960, February). There's Plenty of Room at the Bottom. *Caltech Engineering and Science*, pp. 22-36.
- [Ford, 1985]: Ford, N. (1985). *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy*. Nova Iorque: Plenum Press.
- [Fortner, 2005]: Fortner, J.D.; Lyon, D.Y.; Sayes, C.M.; Boyd, A.M.; Falkner, J.C.; Hotze, E.M.; Alemany, L.B.; Tao, Y.J.; Guo, W.; Ausman, K.D. (2005). C60 in water: nanocrystal formation and microbial response. *Environ. Sci. Technol.* 39, pp. 4307-4316.
- [Gandara, 2012]: Gandara, A. C. P., Dias, F., Oliveira, J. H. M., Gonçalves, R. e Oliveira, P. L. (2012). Os múltiplos papéis dos radicais livres na biologia e na evolução

dos insetos. Em *Tópicos avançados em entomologia molecular*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular.

- [**Ganesh, 2010**]: Ganesh, R.; Smeraldi, J.; Hosseini, T.; Khatib, L.; Olson, B. & Rosso, D. (2010). Evaluation of nanocopper removal and toxicity in municipal wastewaters. *Environ. Sci. Technol.*, 44, pp. 7808-7813.
- [**Gottschalk, 2011**]: Gottschalk, F., & Nowack, B. (2011). The release of engineered nanomaterials to the environment. *J. Environ. Monit.*, 13, pp. 1145-1155.
- [**Government, 2006**]: Government, A. (2006, Setembro). Nanomaterials.
- [**Jorand, 1998**]: Jorand, F.; Boue-Bigne, F.; Block, J.; Urbain, V. (1998). Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances. *Water Sci. Technol.* 37, pp. 307-315.
- [**Keddie, 2010**]: Keddie, J. L.; Routh, A. F. (2010). Fundamentals of latex film formation – processes and properties. Springer.
- [**Kiser, 2009**]: Kiser, M.; Westerhoff, P.; Benn, T.; Wang, Y.; Pérez-Rivera, J. & Hristovski, K. (2009). Titanium nanomaterial removal and release from wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.*, 43, pp. 6757-6763.
- [**Kiser, 2010**]: Kiser, M.; Ryu, H.; Jang, H.; Hristovski, K. & Westerhoff, P. (2010). Biosorption of nanoparticles to heterotrophic wastewater biomass. *Water Research*, 44, pp. 4105-4114.
- [**Limbach, 2005**]: Limbach, L.K.; Li, Y.; Grass, R.N.; Brunner, T.J.; Hintermann, M.A.; Muller, M.; Gunther, D.; Stark, W.J. (2005). Oxide nanoparticles uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration and diffusion at low concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 9, pp. 9370-9376.
- [**Lisunova, 2006**]: Lisunova, M.O.; Lebovka, N.I.; Melezhyk, O.V.; Boiko, Y.P. (2006). Stability of the aqueous suspensions of nanotubes in the presence of nonionic surfactant. *J. Colloid Interf. Sci.* 299, pp. 740-746.
- [**Luongo, 2010**]: Luongo, L. & Zhang, X. (2010). Toxicity of carbon nanotubes to the activated sludge process. *Journal of hazardous materials*, 178, pp.356-362.
- [**Nanopharmaceuticals, 2011**]: retirado em 29 de março de 2011, de [http://www.nanopharmaceuticals.org/Polymeric\\_nanoparticles.html](http://www.nanopharmaceuticals.org/Polymeric_nanoparticles.html)
- [**Nanotech-101, 2011**]: National Nanotechnology Initiative. Retirado em 13 de novembro de 2011, de <http://www.nano.gov/nanotech-101/what/nano-size>.
- [**ObservatoryNANO, 2010**]: ObservatoryNANO. (2010). *Developments in nanotechnologies: regulation standards*.
- [**ObservatoryNANO, 2011**]: ObservatoryNANO. (2011). *Developments in nanotechnologies: regulation standards*.

- [**OECD, 2010**]: OECD. (2010). Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation - Test Guideline N.º 209. *Guidelines for the testing of chemicals*. Paris: OECD.
- [**Paquim, 2009**]: Paquim, A. M., & Brett, A. M. (2009). Microscopia de Força Atômica de moléculas de DNA adsorvidas na superfície de HOPG. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, pp. 57-68.
- [**Petosa, 2010**]: Petosa, A.; Jaisi, D.; Quevedo, I.; Elimelech, M.; Tufenkji, N. (2010). Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: role of physicochemical interactions. *Environmental Science and Technology*, 44, pp. 6532-6549.
- [**Science in your eyes, 2012**]: retirado em 11 de julho de 2012, de [http://scienceinyoureyes.memphys.sdu.dk/atomkraftmikroskopi\\_en.php](http://scienceinyoureyes.memphys.sdu.dk/atomkraftmikroskopi_en.php)
- [**Senjen, 2009**]: Senjen, R. (2009). Nanotechnologies in the 21st century: nanomaterials - health and environmental concerns. *European Environmental Bureau*, pp. 4-7.
- [**Sperling, 2007**]: Sperling, M. V. (2007). Biological Wastewater Series: *Activated Sludge and Aerobic Biofilm reactor – volume 5*. IWA Publishing, Londres.
- [**Tirado-Miranda, 2003**]: Tirado-Miranda, M.; Schmitt, A.; Callejas-Fernandez, J.; Fernandez-Barbero, A. (2003). The aggregation behavior of protein-coated particles: a light scattering study. *Eur. Biophys. J.* 32, 128–136.
- [**Tchobanoglous, 2003**]: Tchobanoglous, G.; Burton, F.L.; Stensel, H.D. (2003). *Wastewater Engineering, treatment and reuse*. 4<sup>th</sup> edition revised. Metcalf & Eddy, Inc.
- [**Waters, 1988**]: Waters, d. o. (1988). Waters model U6K Universal Liquid Chromatograph Injector Operator's Manual. Massachusetts, U.S.A.
- [**Waters, 1990**]: Waters, d. o. (1990). Waters model 510 HPLC pump Operator's Manual. Massachusetts, U.S.A
- [**Wilen, 2003**]: Wilen. B.; Jin, B.; Lant, P. (2003). The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Research*, 37, pp. 2127-2139.
- [**Yin, 2009**]: Yin, Y.; Zhang, X.; Graham, J.; Luongo, L. (2009). Assessment of single-walled carbon nanotubes in an activated sludge wastewater treatment process. *J. of Environ. Sci. Health*, A44, pp. 661-665.
- [**Zheng, 2011**]: Zheng, X.; Wu, R. & Chen, Y. (2011). Effects of ZnO nanoparticles on wastewater biological nitrogen and phosphorous removal. *Environ. Sci. Technol.*, 45 (7), pp. 2826–2832.



**Anexo 1 - Resumo da Comunicação em Poster**  
**Apresentada no ICOEH - *International Conference***  
***on Occupational and Environmental Health* – 17 a 19**  
**de outubro de 2011 Porto, Portugal**



**Anexo 2 - Programa da Workshop em Projetos de Engenharia – IPS, em que se falou sobre “Efeitos da presença de nanopartículas poliméricas existentes em tintas aquosas num tratamento por lamas ativadas” – 3 de novembro de 2011, Setúbal, Portugal**

**Anexo 3 - Resumo da Comunicação em Poster**  
**Apresentada no MACRO 2012 - *IUPAC World***  
***Polymer Congress* - 24 a 29 junho 2012, Blackburg,**  
**USA**

**Anexo 4 - Resumo da Comunicação Oral**  
**Apresentada no 9th ISEG - *International Symposium***  
***on Environmental Chemistry* – 15 a 22 julho 2012,**  
**Aveiro, Portugal**

P17 – October 19

**EFFECTS OF POLYMERIC NANOPARTICLES PRESENT IN AQUEOUS PAINTS IN ACTIVATED SLUDGE TREATMENT****Alexandra Nobre, A. Barreiros, S. Piçarra**

Escola Superior de Tecnologia de Setúbal, Instituto Politécnico de Setúbal, Campus do IPS, Estefanilha, 2910-761 Setúbal, Portugal.  
E-mail: alexandranobre@gmail.com.

During the last years solvent based paints have been substituted by aqueous paints, due to the increasing pressure from EU legislators to reduce the emissions of volatile organic compounds (VOCS). The largest household use of aqueous paints is for architectural or decorative paints, which typically comprise emulsified acrylic or styrene-acrylic nanoparticles in water. It is well established that these materials are biocompatible when used in macroscopic scale but more studies have to be made to understand their effects as nanoparticles.

In their life cycle, aqueous paints will eventually be discharged into wastewater treatment facilities, where the polymeric nanoparticles can work as xenobiotics to the microbial communities present in activated sludge. If the polymeric nanoparticles are neither degraded by the microorganisms nor precipitated into the sludge, they will remain in the treated water and may be incorporated into plants, seaweeds or other water organisms. Should this happen environmental health can be at risk.

Therefore the purpose of this study was to follow the polymeric nanoparticles, used as base of aqueous paintings, in a wastewater treatment plant and their influence on the activated sludge process. An aqueous emulsion of cross-linked poly(butyl methacrylate) nanoparticles of ca. 50 nm diameter was used as a generic model for paints. Particles were synthesized and characterized by Dynamic Light Scattering. In order to study the influence of this xenobiotic in the microorganisms specific respiration rate, activated sludge from a waste-water treatment plant was tested by the OCDE's respiration inhibition test, using several concentrations of PBMA nanoparticles. Particles aggregation was followed in the activated sludge medium by Dynamic Light Scattering. It was observed that the nanoparticles presence increases the specific respiration rate of the microorganisms, suggesting a stress situation.

**= FEIRA DE PROJECTOS =**

**2, 3 e 4 de Novembro**

## **Workshop em Projecto de Engenharia (3 de Novembro)**

**Organização: ESTSetúbal**

**Local / Sala: ESTSetúbal - Auditório A1**

10h00 – Abertura dos trabalhos

10h15

**A1.** Efeitos da presença de nanopartículas poliméricas existentes em tintas aquosas num tratamento por lamas activadas  
(*Eng<sup>a</sup>. Alexandra Nobre*)

10h35

**A2.** Caracterização do ruído junto a um parque de geradores eólicos  
(*Eng<sup>a</sup>. Tatiana Pardal*)

10h55

**A3.** Sistema semi-automático de coloração de lâminas  
(*Cátia Mesquita*)

11h15

**A4.** Projecto e fabrico de um simulador de voo na ESTSetúbal  
(*Prof. Nuno Nunes*)

11h35

**A5.** Sistema de aquisição de dados baseado em CAN para um simulador de voo  
(*Prof<sup>a</sup>. Ana Antunes*)

11h55

**A6.** Máquina de ensaios de fadiga biaxial  
(*Prof. Ricardo Cláudio*)

12h15 – Encerramento dos trabalhos

# EFFECT OF POLYMERIC NANOPARTICLES FROM AQUEOUS PAINTS IN A WWT BIOLOGICAL PROCESS

A. Nobre,<sup>1</sup> A. M. Barreiros,<sup>1,2</sup> S. Piçarra<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Escola Superior de Tecnologia de Setúbal, Instituto Politécnico de Setúbal, Estefanilha, 2910-761 Setúbal, Portugal

<sup>2</sup> DEQ-ISEL/IPL, Rua Conselheiro Emídio Navarro, 1, 1959-007 Lisboa

<sup>3</sup> IN-CQFM, Complexo I, IST, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa  
susana.goncalves@estsetubal.ips.pt

## Introduction

Despite the booming application of nanotechnology, there have been several serious implications that are coming into light in recent years within different environmental compartments, namely air, water, and soil and also its likely impact in human health.

Paints and coatings industry is not an exception. Pushed by legislation, solvent-borne formulations (with high emissions of volatile organic solvents) have been gradually substituted by aqueous based formulations that, instead, use polymeric nanoparticles emulsions as binders. However, as a part of these products life-cycle, paints end up discharged into wastewater treatment facilities (WWT), where their polymeric nanoparticles work as xenobiotics to the microbial communities present in the activated sludge process.

It is well established that binder materials used for architectural or decorative paints purposes (mainly acrylic and styrene-acrylic) are biocompatible at macroscopic level but their effect as nanoparticles has not yet been studied.

This work presents a laboratorial study of the influence of well characterized acrylic nanoparticles in a biological process, as a model for the effect of the aqueous decorative paints in the activated sludge process of a WWT plant.

## Experimental

**Sludge.** Sludge was collected from Setúbal Wastewater Treatment Plant (WWTP) in Portugal, which treats mainly domestic sewage and serves approximately 253 000 inhabitants (27.922 m<sup>3</sup>/day). Sludge was collected at the recirculating point of the activated sludge tank and was kept at 4°C between the experiments (over a maximum period of one week).

**Polymeric Nanoparticles.** Fully cross-linked poly(butyl methacrylate) nanoparticles of ca. 50 nm diameter were produced by batch emulsion polymerization in the presence of a cross-linking agent, ethylene glycol dimethacrylate.

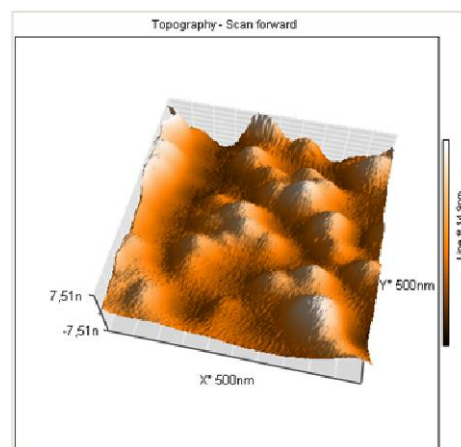
**Nanoparticles Characterization.** Particles in liquid media were characterized by Dynamic Light Scattering with multi-angle detection (DLS-MALDI) and Gel Permeation Chromatography (GPC). Solids were observed by Atomic Force Microscopy (AFM).

## Results and Discussion

**Batch Reactors.** Activated sludge collected from WWT plant was centrifuged 3 times and re-suspended in a synthetic medium.<sup>1</sup> This re-suspended sludge was tested in several aerated batch reactors in the presence of different concentrations of PBMA nanoparticles (ranging from 0 to 100 ppm). Oxygen consumption was measured by the OCDE's respiration inhibition test<sup>1</sup> and results demonstrated that microorganisms consume more oxygen in the presence of nanoparticles than alone, suggesting that nanoparticles induce stress in the microorganisms. Particle aggregation in the liquid phase was followed by Dynamic Light Scattering. DLS experiments were performed over time (each 3 h) and both single nanoparticles and small aggregates were always detected; aggregates diameter slightly increased in time, until a final value of ca. 200 nm (after 9 h experiment). The same particle diameters were observed in a blank assay, performed in an extra reactor with 30 ppm nanoparticles suspended in the same medium (without microorganisms). Indeed, particle aggregation was mainly promoted by the synthetic medium itself (due to its properties, like ionic strength, etc.) and microorganisms' contribution for the aggregation process could not be proved.

Liquid phases were filtered (with 450 nm membranes) to remove microorganisms, freeze-dried, dissolved in a good solvent (THF) and analyzed by GPC. No free chains were observed, meaning that no polymeric bounds from the nanoparticles were disrupted.

After the first hour of all batch experiments, a part of the microorganisms originally in suspension become deposited in the walls of the reactors, above the liquid line. AFM images of the solid phases (microorganisms in suspension and deposited on the reactor walls) were quite different: while the former keep their morphology, the microorganisms deposited on the reactors walls assumed rough surfaces with hilly like shapes of ca. 50 nm (see Figure 1).



**Figure 1.** AFM image of the surface of a microorganism collected from the wall of a batch reactor (500 nm x 500 nm).

**Sequential Batch Reactors.** Two sequential batch reactors (SBRs) were inoculated with the same activated sludge and performed in cycles of 8 h (7 h stirring and aeration + 45 min settlement + 15 min feeding), which corresponds to a hydraulic retention time of 16,6 h. While the bank-reactor was fed only with a synthetic medium,<sup>2</sup> 30 ppm of nanoparticles were also included into the test-reactor feed medium.

Insignificant differences in carbon consumption were observed between reactors. However, nitrification process was clearly less efficient in the test reactor, fed with nanoparticles.

## Conclusions

Despite poly(butyl methacrylate) being a biocompatibility material at macroscopic scale, it is likely to be no longer innocuous at nanoscale.

From the performed experiments it is possible to conclude that these nanoparticles, even at the same residual concentrations that in a WWT plant,<sup>3</sup> cannot be removed by the microorganisms, being incorporated or adsorbed in their surfaces instead. These processes create stress (increasing the overall respiration rate) and in some cases, organisms' lysis. In the whole, nanoparticles presence has a negative impact on the nitrification process. For longer exposure times, these polymeric nanoparticles are to create gradual changes in the microbiological community, thus affecting the efficiency of the biological treatment.

As it was proved that nanoparticles are not destroyed, further work on the destination of nanoparticles after the WWT treatment has to be done, together with its nanoeotoxicological consequences.

**Acknowledgement.** This work was supported by Instituto Politécnico de Setúbal through the project IPS. Ref: 3 CP-IPS-7-2009. Prof. José Paulo Farinha is acknowledged by the AFM images.

## References

- (1) *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, **2010**, method 209.
- (2) Barreiros, L.; Nogales, B.; Manaia, C. M.; Ferreira, A. C.; Pieper, D. H.; Reis, M. A.; Nunes, O. C. *Environ. Microbiol.* **2003**, *5*, 944.
- (3) Bar, S. K.; Verma, M.; Tyagi, R. D.; Surampalli, R. Y. *Waste Management* **2010**, *30*, 504.

## Is it possible to remove polymeric nanoparticles from aqueous paints during the activated sludge treatment?

<sup>a</sup>Nobre A, <sup>b</sup>Barreiros A M, <sup>a,c</sup>Piçarra S

The market for emulsion polymers (latexes) is large and growing at the expense of other manufacturing processes that emit higher amounts of volatile organic solvents. The paint industry is not an exception and solvent-borne paints have been gradually substituted by aqueous paints.

In their life-cycle, much of the aqueous paint used for architectural or decorative purposes will eventually be discharged into wastewater treatment facilities, where its polymeric nanoparticles (mainly acrylic and styrene-acrylic) can work as xenobiotics to the microbial communities present in activated sludge.

It is well established that these materials are biocompatible at macroscopic scale. But is their behaviour the same at nanoscale? What happens to the polymeric nanoparticles during the activated sludge process? Do nanoparticles aggregate and are discharged together with the sludge or remain in emulsion? How do microorganisms interact with these nanoparticles? Are nanoparticles degraded by them? Are they adsorbed? Are these nanoparticles toxic to the microbial community?

To study the influence of these xenobiotics in the activated sludge process, an emulsion of cross-linked poly(butyl methacrylate) nanoparticles of ca. 50 nm diameter was produced and used as model compound.

Activated sludge from a wastewater treatment plant was tested by the OCDE's respiration inhibition test<sup>1</sup> using several concentrations of PBMA nanoparticles. Particle aggregation was followed by Dynamic Light Scattering and microorganism surfaces were observed by Atomic Force Microscopy.

Using sequential batch reactors (SBRs) and continuous reactors, both inoculated with activated sludge, the consumption of carbon, ammonia, nitrite and nitrate was monitored and compared, in the presence and absence of nanoparticles.

No particles were detected in all treated waters by Dynamic Light Scattering. This can either mean that microorganisms can efficiently remove all polymer nanoparticles or that nanoparticles tend to aggregate and be naturally removed by precipitation. Nev-

ertheless respiration inhibition tests demonstrated that microorganisms consume more oxygen in the presence of nanoparticles, which suggests a stress situation. It was also observed a slight decrease in the efficiency of nitrification in the presence of nanoparticles. AFM images showed that while the morphology of some organisms remained the same both in the presence and absence of nanoparticles, others assumed a rough surface with hilly like shapes of ca. 50 nm when exposed to nanoparticles.

Nanoparticles are thus likely to be either incorporated or adsorbed at the surface of some organisms,

increasing the overall respiration rate and decreasing nitrification efficiency. Thus, despite its biocompatibility at macroscopic scale, PBMA is likely to be no longer innocuous at nanoscale.

<sup>1</sup> OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 209 (2010)

<sup>a</sup> Escola Superior de Tecnologia de Setúbal, Instituto Politécnico de Setúbal, Campus do IPS, Estefanilha, 2910-761 Setúbal, Portugal

<sup>b</sup> Área Departamental de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Rua Conselheiro Emídio Navarro, 1, 1959-007 Lisboa (abarreiros@deq.isel.ipl.pt)

<sup>c</sup> IN-CQFM Instituto de Nanociências e Nanomateriais – Centro de Química Física Molecular, Complexo I, IST, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa